



## Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

# Rol de MeCP2 en respuestas neuroinmunes en un modelo animal de Desórdenes del Neurodesarrollo

Tesista: Biól. María Inés Zalosnik

*–Córdoba, 2020–*

Centro de Investigaciones en Química Biológica. CIQUIBIC–CONICET  
Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto  
Facultad de Ciencias Químicas  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

---



## **Directora**

Dra. Alicia Degano

## **Comisión evaluadora**

Dra. Maria Ana Contin

Dra. Teresa Scimonelli

Dra. Claudia Sotomayor

Dra. Clara Patricia Settón (evaluadora externa)







# INDICE

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	Pág. 1
<b>RESUMEN</b>	Pág. 3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>CAPITULO 1: ASPECTOS GENERALES DE SINDROME DE RETT</b>	
El síndrome de Rett	Pág. 6
Progresión clínica	Pág. 6
Patofisiología en RTT	Pág. 8
Etiología	Pág. 9
Síndrome de RTT en varones	Pág. 10
MeCP2: Methyl-CpG binding protein	Pág. 11
Estructura de MeCP2	Pág. 11
Expresión y localización de MeCP2	Pág. 13
Modificaciones post-traduccionales de MeCP2	Pág. 13
Función de MeCP2	Pág. 15
Modelos animales usados para estudiar MeCP2	Pág. 18
<b>CAPITULO 2: SISTEMA INMUNOLÓGICO E INTERACCIONES NEUROINMUNES</b>	
El sistema inmune: componentes y funciones	Pág. 20
Inflamación: sus componentes celulares y efectos	Pág. 21
Macrófagos	Pág. 23
Vías de activación de macrófagos	Pág. 24
Macrófagos M1 o activados clásicamente	Pág. 26
Macrófagos M2 o activados alternativamente	Pág. 28
Componentes de la inmunidad adaptativa	Pág. 30
Diversidad fenotípica de linfocitos T CD4+	Pág. 31
El eje neuroinmune	Pág. 34
Células y mediadores inmunes en el Sistema Nervioso	Pág. 34
<b>CAPITULO 3: ALTERACIONES NEUROINMUNES EN RETT</b>	
Influencia de MeCP2 en el sistema inmune	Pág. 37
Antecedentes de alteraciones inmunes en humanos	Pág. 38
MeCP2 y estrés oxidativo	Pág. 39
Estudio de respuestas neuroinflamatorias:	
Estrategia para evaluar el rol de MeCP2 en respuestas neuroinmunes	Pág. 40
Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE)	Pág. 41
Mecanismo patogénico de la EAE	Pág. 41
<b>HIPÓTESIS</b>	Pág. 44

<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo General	Pág. 46
Objetivos Específicos	Pág. 46
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>MODELOS <i>IN-VIVO</i> E <i>IN-VITRO</i></b>	Pág. 48
Modelo animal: ratones MeCP2 <sup>308/y</sup>	Pág. 48
Modelo <i>in-vitro</i> : obtención de macrófagos derivados de médula ósea	Pág. 49
<b>REACTIVOS</b>	Pág. 50
<b>METODOLOGÍA</b>	Pág. 51
Genotipificación de ratones	Pág. 51
Aislamiento ADN genómico	Pág. 51
Reacción en cadena de la ADN polimerasa	Pág. 51
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	Pág. 52
<b>Diseño Experimental Parte I</b>	Pág. 53
<b>Métodos Parte I</b>	Pág. 54
Caracterización de poblaciones celulares por citometría de flujo	Pág. 54
Ensayo de producción de Óxido Nítrico	Pág. 54
Producción de radical superóxido	Pág. 54
RT-PCR en Tiempo Real	Pág. 55
Purificación de ARN y síntesis de ADNc	Pág. 55
Transcripción reversa	Pág. 55
PCR en Tiempo Real	Pág. 55
Semi-cuantificación de ARNm	Pág. 56
<b>Diseño Experimental Parte II</b>	Pág. 57
<b>Métodos Parte II</b>	Pág. 58
Inducción de la Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)	Pág. 58
Preparación de tejidos para inmunohistoquímica e histología	Pág. 60
Perfusión	Pág. 60
Preparación de Crio secciones	Pág. 60
Inmunohistoquímica para Iba-1	Pág. 61
Análisis de microgliosis	Pág. 61
Tinción con Azul de Toluidina	Pág. 62
RT-PCR en Tiempo Real	Pág. 63
Obtención de células mononucleares de bazo y análisis de citoquinas y proliferación	Pág. 63
Aislamiento de células mononucleares de bazo	Pág. 63
Determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos	Pág. 63
Ensayo de proliferación celular	Pág. 64
<b>Métodos Anexo</b>	Pág. 65
Determinación de niveles de especies reactivas del oxígeno en sangre total	Pág. 65
Western Blotting	Pág. 65
Obtención de suero de animales MUT y WT	Pág. 65
Extracción de proteínas totales de cerebro y cerebelo	Pág. 65
Realización de Geles de Acrilamida	Pág. 66
Análisis estadístico	Pág. 66



**RESULTADOS**

<b>PARTE I: ESTUDIOS <i>IN-VITRO</i>. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN MACROFAGOS DIFERENCIADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES DIFICIENTES PARA MECP2</b>	Pág. 69
MDMO provenientes de ratones WT y MeCP2-MUT muestran niveles similares de diferenciación	Pág. 70
MDMO- MUT muestran un perfil M1 exacerbado y un déficit de respuestas M2 cuando son expuestos a estímulos polarizantes	Pág. 71
MDMO-MUT produjeron mayores niveles de radical superóxido pero no de ON	Pág. 75
CONCLUSIONES PARTE I	Pág. 77
 <b>PARTE II: ESTUDIOS <i>IN-VIVO</i>. EVALUACION DEL DESARROLLO DE RESPUESTAS INFLAMATORIAS EN RATONES DEFICIENTES PARA MECP2 FRENTE A UN DESAFÍO AUTOINMUNE</b>	 Pág. 78
Ratones MeCP2 MUT muestran mayor vulnerabilidad al desarrollo de la EAE	Pág. 79
Ratones MeCP2 MUT muestran un mayor perfil inflamatorio periférico diferencial y persistente	Pág. 81
MeCP2 no influencia el nivel de proliferación de CMN en etapa crónica	Pág. 88
Ratones MUT evidencian mayor nivel de infiltrados celulares en médula	Pág. 89
Ratones WT y MUT muestran niveles similares de microgliosis durante la EAE	Pág. 93
Ratones MeCP2 MUT muestran un perfil de expresión diferencial de mediadores inmunes durante la EAE crónica	Pág. 97
CONCLUSIONES PARTE II	Pág. 101
 <b>ANEXO: EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS REACTIVOS Y ROS EN RATONES MUTANTES PARA MECP2</b>	
<b>CONDICIONES BASALES</b>	Pág. 103
Mutaciones en MeCP2 no influencia la presencia de autoanticuerpos reactivos antígenos propios del sistema nervioso central (SNC)	Pág. 103
MeCP2 influencia el balance redox en animales MUT	Pág. 107
 <b>DISCUSIÓN</b>	
Discusión de resultados parte I: estudios <i>in-vitro</i>	Pág. 109
<b>RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS</b>	Pág. 116
Discusión de resultados parte II: estudios <i>in-vivo</i>	Pág. 117
<b>RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS</b>	Pág. 127
 <b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	 Pág. 129
 <b>INDICE DE FIGURAS</b>	 Pág. 131
 <b>INDICE DE TABLAS</b>	 Pág. 133
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	 Pág. 135



# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN complementario  
AMPA: receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionico  
ANOVA: análisis de la varianza  
ARG-1: Arginasa-1  
ARN: ácido ribonucleico  
ASC: proteína tipo punto asociada a apoptosis  
BHE: barrera hematoencefálica  
CAMKII: calcio calmodulina quinasa II  
CAT: catalasa  
CCL: ligando de quimioquina  
CD-86, 80, 206: cluster de diferenciación  
CFA: adyuvante completo de Freund  
CMN: células mononucleares  
CPA: célula presentadora de antígenos  
CXCL: C-X-C motivo  
D-PBS: tampón fosfato salino de Dulbecco  
DAMPs: patrones moleculares asociados a daño  
DO: densidad óptica  
Dpi: días post inmunización  
EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental  
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
EO: estrés oxidativo  
EPR: resonancia espectroscópica electrónica  
FIZZ1: proteína tipo resistina 1  
GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa  
GFAP: proteína fibrilar ácida de la glia  
Gpx: glutatión peroxidasa  
Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizada  
IFM: intensidad de fluorescencia media  
IFN $\gamma$ : interferón gamma  
IgG, IgM: inmunoglobulina G y M  
IL: interleuquina  
iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible  
JAK: quinasa Janus

LPS: lipopolisacárido  
MDMO: macrófagos diferenciados de médula ósea  
MeCP2: proteína de unión a metil citosina guanosina 2  
MeCP2 *null*: ratones que no expresan MeCP2  
MHC: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad  
miR24, miR-181: micro RNA 24 y 181  
MOG: glicoproteína de mielina de oligodendrocito  
NAPDH: nicotinamida adenina dinucleotico fosfato  
NBT: nitroblue tetrazolium  
NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B  
NK: natural killer  
NLRP3: dominio pirina de la familia NLR que contiene 3  
NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato  
nNOS: óxido nítrico sintetasa neuronal  
ON: óxido nítrico  
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: tampón fosfato salino  
PCR: reacción en cadena de polimerasa  
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
RNS: especies reactivas del nitrógeno  
RTT: Rett Syndrome  
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico  
SFB: suero fetal bovino  
SN: sistema nervioso  
SNC: sistema nervioso central  
SOCS5: supresor de la señalización de citoquinas 5  
SOD: enzima superóxido dismutasa  
STAT: transductor de señal y activador de la transcripción  
Tfh: célula ayudante T folicular  
TGF: factor de crecimiento transformante  
Th: célula T ayudante o *helper*  
TLR: receptores tipo Toll  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
Treg: célula T regulatoria  
UA: unidad arbitraria

# RESUMEN

El Síndrome de Rett es un desorden severo y progresivo ligado al sexo, ya que se manifiesta como una enfermedad neurológica vinculada a mutaciones en el gen MeCP2 que se localiza en el cromosoma X. MeCP2 se expresa en todos los tejidos, en especial en neuronas y, por ende, mayormente se han descrito y estudiado mecanismos de la falta de MeCP2 en estas células. Sin embargo, en los últimos años se ha podido establecer que MeCP2 se expresa en células inmunes.

Hasta el momento no se ha establecido cómo la presencia de la proteína MeCP2 truncada o mutante (MUT) puede mantener ciertas funciones esenciales para las respuestas inmunes tanto a nivel del sistema nervioso como en el resto de la fisiología del organismo. Dado que en humanos con RTT MeCP2 se expresa como una proteína “parcialmente funcional”, el objetivo de esta tesis fue el de evaluar si la mutación en MeCP2 altera o interfiere en respuestas inmunes *in-vitro* e *in-vivo*. Con el fin de caracterizar la respuesta inmune *in-vitro*, macrófagos diferenciados de médula ósea (MDMO) fueron estimulados con LPS+IFN $\gamma$  o IL-4 para caracterizar las respuestas M1 y M2 respectivamente. Para el análisis *in-vivo*, ratones MUT fueron expuestos a un desafío autoinmune, la EAE -encefalomielitis autoinmune experimental- y se estudió la respuesta inmune en SNC y bazo.

El análisis *in-vitro* de MDMO mostró que la mutación en MeCP2 interfiere con la respuesta inmune. MDMO estimulados con LPS+IFN $\gamma$  respondieron expresando mayores niveles de TNF $\alpha$ , una citoquina prototípica del perfil M1. Además, se observó que en MDMO-MUT estimulados con IL-4, el nivel de expresión de IL-10 y FIZZ1 fue menor respecto al expresado por MDMO-WT. Además, MDMO-MUT no pudieron aumentar la expresión del receptor de manosa y marcador prototípico de macrófagos M2, CD206, al ser expuestos a IL-4. Esto indicaría que mutaciones en MeCP2 en macrófagos lleva a una desregulación de la respuesta inmune al mostrar un perfil exacerbado pro-inflamatorio y al interferir con producir respuestas inmunoregulatorias frente a estímulos polarizantes.

Para el estudio *in-vivo*, ratones WT y MUT se inmunizaron con MOG (glicoproteína de mielina de oligodendrocito) en emulsión con el adyuvante completo de Freund. Posteriormente se analizaron los signos clínicos diariamente identificando la flacidez en cola y patas traseras. Se sacrificaron en etapa aguda (12 días post inducción -dpi-) y crónica de la

EAE (30 dpi). Al estudiar la respuesta de ratones MUT-EAE, se pudo establecer que MeCP2 es un factor necesario para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Ratones MUT-EAE mostraron un inicio de la enfermedad precoz y signos clínicos más severos que animales WT inmunizados con MOG. Además, los signos clínicos en la etapa aguda, fue acompañada por un aumento de infiltrados celulares en médula espinal (sitio blanco de la EAE) sin afectar la expresión de Iba-1 ni el nivel de microgliosis. A nivel periférico se pudo determinar que, durante la etapa aguda de la EAE, células mononucleares (CMN) aisladas de bazo de animales MUT-EAE y re-estimuladas *in-vitro*, liberaron mayores cantidades de IL-2 e IL-4 al medio y menores de IL-10. Durante la EAE en etapa crónica se pudo evidenciar que animales MUT tardaron más tiempo en la recuperación que animales WT.

En el SNC, a los 30 dpi, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de infiltración entre animales MUT y WT, al igual que en el nivel de microgliosis. Sin embargo, al analizar el nivel de expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , se pudo determinar que animales MUT mantenían niveles más elevados que los WT. Esto indicaría que existe una alteración en la respuesta inmune a largo plazo, luego de un desafío autoinmune. Al evaluar el perfil inmunológico periférico al aislar CMN de bazo y re-estimulándolas *in-vitro* con MOG, se pudo determinar que estas poblaciones celulares mantienen una reactividad exacerbada frente a MOG ya que, en su presencia, se liberaron mayores cantidades de IFN $\gamma$ . Finalmente, el análisis de expresión génica en médulas obtenidas durante la etapa crónica, determinó que el desbalance de la producción de citoquinas como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  también está representado a nivel del SNC. Además, se pudo determinar que ratones MUT-EAE, expresaron mayores niveles de IL-1 $\beta$ , y menores de IL-10, FoxP3 y CX<sub>3</sub>CR1.

En conclusión, mutaciones en MeCP2 generan mayor susceptibilidad al desarrollo de estados inflamatorios. Los principales cambios en respuestas inmunes mediados por MeCP2 mutada dependen de su activación ya que induce un balance pro/anti inflamatorio alterado en condiciones polarizantes. Este trabajo es el primero en demostrar que mutaciones en MeCP2 llevan a deficiencias en la función de macrófagos para responder en condiciones polarizantes anti-inflamatorias. Resulta importante en el futuro poder evaluar posibles genes blanco susceptibles a una regulación epigenética. Estos estudios podrán sentar las bases para comprender la patogénesis molecular y celular subyacente de RTT, y diseñar estrategias terapéuticas efectivas.



# INTRODUCCIÓN



# CAPITULO 1

## Aspectos Generales del Síndrome de Rett

### SINDROME DE RETT

---

El Síndrome de Rett (RTT, OMIM #312750) es un desorden severo y progresivo ligado al sexo, que se manifiesta como una enfermedad neurológica vinculada a mutaciones en el cromosoma X. Afecta principalmente a niñas de todas las razas y grupos étnicos con una incidencia de 1/10000-15000 nacimientos, y representa la segunda causa de retraso mental en niñas<sup>1</sup>. Esta patología fue descrita por primera vez por el Dr. Andreas Rett en el año 1966<sup>2</sup>. Sin embargo, casi veinte años después, y gracias a los aportes realizados por Bengt Hagberg y colegas, se volvió ampliamente conocida.

### Progresión clínica de RTT

Desde la caracterización del Síndrome de RTT, el mismo se ha definido como un desorden en el cual las niñas afectadas muestran un desarrollo post natal aparentemente normal durante los primeros 6 a 18 meses de edad. Durante ese tiempo logran desarrollar habilidades lingüísticas/comunicativas y caminar, sin embargo, luego acontece un periodo de regresión de habilidades cognitivas y motoras lo cual es característico de este desorden<sup>3</sup>. Recientemente, bajo revisión de casos de niñas con RTT, se ha propuesto que existirían anomalías previas a la etapa de regresión<sup>4</sup>. Los primeros indicios de que el desarrollo en RTT no es completamente normal proviene de investigaciones retrospectivas que evidencian



deficiencias tempranas en el rendimiento motor grueso avanzado de niñas en RTT, como la falta o retraso en la adquisición de la capacidad de sentarse y caminar solos o de gatear, en ausencia de alteraciones en la capacidad de rodar y sentarse con apoyo<sup>5</sup>. El estudio de material videográfico mostró que niñas diagnosticadas con RTT clásica presentan un pobre repertorio de patrones motores espontáneos, que generalmente involucran secuencias monótonas, y movimientos espasmódicos<sup>4</sup>. También se han observado conductas de interacción social reducidas y características similares a las del autismo durante los primeros meses de vida, incluyendo un pobre repertorio de gestos comunicativos, baja capacidad de respuesta cuando se le llama por su nombre, expresiones faciales anormales y deficiencias lingüísticas<sup>6</sup>.

Se han diferenciado cuatro etapas en el periodo de regresión y desarrollo del fenotipo patológico. En una primera etapa (pre-regresión), las niñas presentan microcefalia y un retraso generalizado del crecimiento caracterizado por pérdida de peso e hipotonía muscular<sup>7</sup>. Posteriormente, en la etapa II, se produce una regresión rápida en la cual se desarrollan las típicas condiciones autistas: pérdida del lenguaje, evitación social y afecciones comunicativas<sup>8</sup>. Asimismo, las habilidades motoras desarrolladas comienzan a perderse de manera parcial o total. Otro rasgo característico es la presencia de comportamientos estereotipados de las manos llamado “lavado de manos o aplausos” (*hand washing o clapping*) y, en casos severos, se desarrolla ataxia<sup>a</sup> y apraxia<sup>bb</sup>. Además, en esta etapa se manifiestan convulsiones epilépticas, apneas, aerofagia e hiperventilación<sup>9</sup>. Seguido de este periodo de regresión rápida, sigue una etapa pseudoestacionaria, momento en el cual pueden reaparecer aquellas habilidades que anteriormente se habían perdido, sin embargo, muchas disfunciones persisten<sup>3</sup>. En una última etapa, se evidencia el deterioro motriz y en algunos casos desarrollan características Parkinsonianas<sup>10</sup>.

Independientemente del tipo de mutación, la severidad de los signos clínicos empeora con la edad<sup>11,12</sup> y la vida media de pacientes con RTT es de unos 40-50 años<sup>13</sup>.

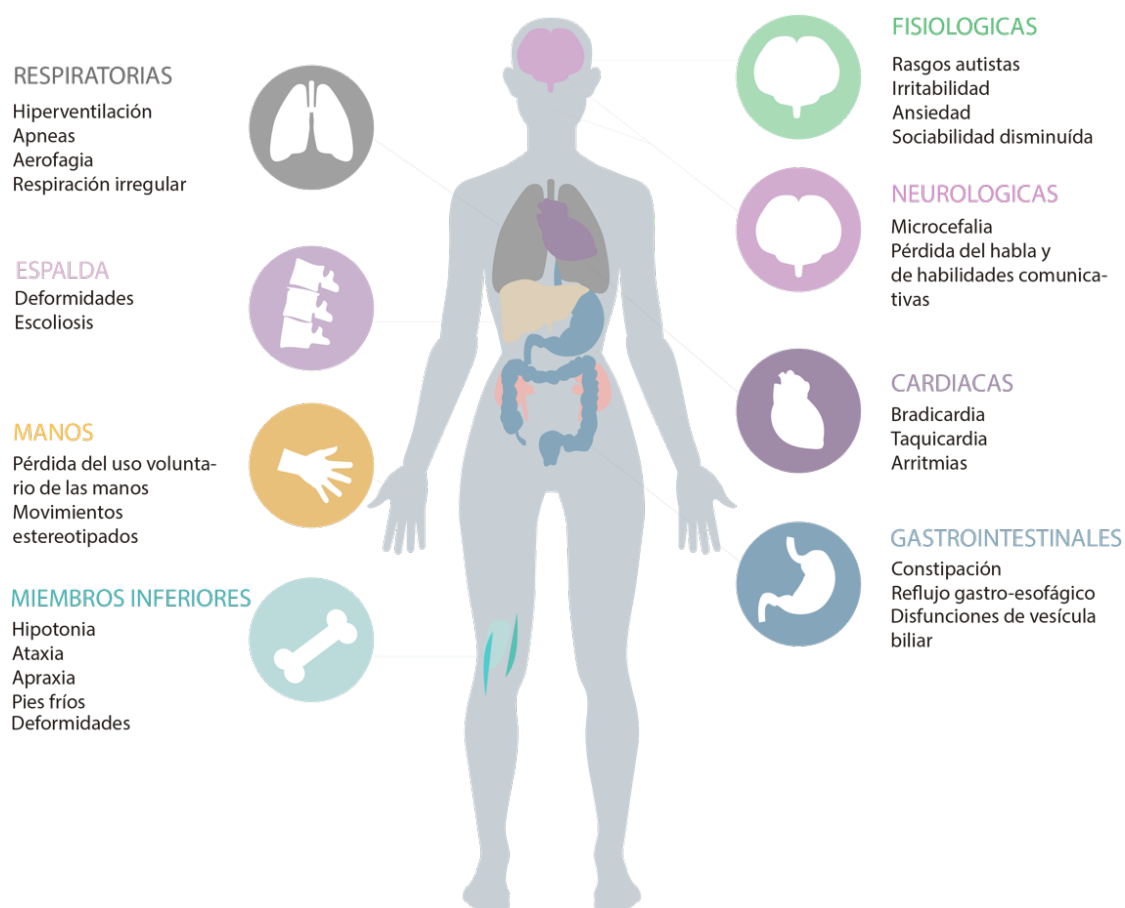
---

<sup>a</sup> Ataxia: compromiso en el control muscular y coordinación de los movimientos voluntarios y provocar dificultades para hablar, mover los ojos y tragar.

<sup>b</sup> Apraxia: incapacidad de llevar a cabo tareas y movimientos voluntarios. Se trata de un trastorno del Sistema nervioso en el que una persona entiende la orden pero no puede ejecutarla.

### Patofisiología en RTT

RTT es un desorden multisistémico (**Figura 1**). Estudios en pacientes con RTT han demostrado que alteraciones tanto a nivel del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico contribuyen a la patofisiología de la enfermedad<sup>14</sup>. A nivel del SNC, el 30% de los pacientes con RTT presentan microcefalia acompañado con una disminución de un 12-34% del volumen del cerebro, siendo las regiones de la corteza prefrontal, posterior frontal y temporal las más afectadas<sup>15</sup>. A su vez, estudios post-mortem han mostrado una disminución de la materia gris, mayor densidad y empaquetamiento de neuronas, reducción de la arborización dendrítica, sin evidencia de neurodegeneración, gliosis o desmielinización<sup>16,17</sup>, indicando que no se trataría de una patología neurodegenerativa. A nivel del sistema auditivo y visual periférico, pacientes con RTT no muestran anormalidades<sup>9</sup>, pero recientemente se determinó que la atención selectiva, que es la capacidad de enfocar o seleccionar un elemento u objeto particular en el ambiente, está comprometida<sup>18</sup>. Problemas comunes a los pacientes con RTT consisten en respiración irregular, hiperventilación, apneas que aparecen alrededor de los 3 a 5 años y empeoran entre los 5 y 15 años, cuando los niños empiezan a realizar actividades que aumentan la agitación y la ansiedad<sup>19</sup>. El mayor problema en pacientes con RTT son las fallas de crecimiento somático y las disfunciones gastrointestinales, las cuales constituyen las bases para la desaceleración del crecimiento<sup>8</sup>. Las disfunciones motoras constituyen el rasgo más importante en RTT. Entre 1 a 4 años de edad, la capacidad de caminar se ve afecta por la ataxia y apraxia y se estima que sólo el 50% de las niñas con RTT podrá caminar<sup>8</sup>.



**Figura 1. Manifestaciones clínicas en Síndrome de Rett.** *RTT es un desorden multisistémico que se caracteriza por presentar distintos grados severidad en niñas. En la ilustración se resumen algunas de las manifestaciones clínicas a nivel de distintos órganos y sistemas.*

### Etiología

Por muchos años RTT fue considerado un enigma ya que los estudios genéticos realizados en pacientes eran limitados al tratarse de casos esporádicos. Actualmente se sabe que el 95% de los casos de RTT clásico se debe a mutaciones en el gen que codifica a la proteína **MeCP2 (proteína de unión a metil-citosina-guanosina 2 o methyl-CpG-binding protein 2)**<sup>20,21</sup>. La mayoría de las mutaciones estudiadas surgen *de novo* en la línea germinal paterna<sup>22</sup>. A lo largo de los años, más de 250 mutaciones se han reportado en niñas con RTT, siendo 8 de ellas las más comunes. También se han observado deleciones grandes en uno o más exones y supresiones 3' en menor cantidad de casos<sup>23</sup>. En general, las mutaciones se caracterizan porque aparecen en regiones enriquecidas en CpG en el gen de MeCP2 y como consecuencia, se produce la pérdida de función resultado de la proteína MeCP2 truncada, anormalmente plegada o inestable. La teoría indica que la mayoría de las mutaciones que se generan *de novo* en células germinales masculinas se deben a la

hipermutabilidad de algunos sitios CpG de MeCP2. Aunque aún no está claro por qué ocurre esta hipermutabilidad, se cree que estos sitios CpG estarían metilados en la línea germinal masculina y, como consecuencia, serían más propensos a la desaminación resultando en la conversión de dinucleótidos CpG en dinucleótidos TpG y CpA<sup>7</sup>.

Se considera que múltiples factores, genéticos, ambientales y epigenéticos, interactúan con la mutación en MeCP2 para dar el fenotipo patológico final y que no siempre existe una correlación directa entre mutaciones específicas y la severidad de los trastornos observados<sup>19</sup>. Asimismo, dado que el gen MeCP2 se encuentra en el cromosoma X, las representaciones fenotípicas de RTT no sólo podrían estar basadas en la mutación en sí misma, sino también en el grado de inactivación de los alelos mutante o salvaje (*wild type*). Aunque la inactivación del cromosoma X suele ser un proceso azaroso, pueden ocurrir grados extremos de inclinación hacia la inactivación preferencial del cromosoma X paterno o materno. Por ejemplo, en ratones hembras se ha observado que existe una ventaja selectiva de células que expresan el alelo MeCP2 salvaje<sup>24</sup>. Un trabajo reciente demostró que el mosaicismo somático para MeCP2 contribuye directamente a la patogenicidad del RTT, especialmente en varones. Este es un mecanismo que ha sido subestimado pero que subyace al sesgo de origen paterno de las variantes de la MeCP2 por lo que existiría una alta proporción de mosaicismo de la línea germinal paterna de MeCP2<sup>25,26</sup>.

Cientos de mutaciones en el gen MeCP2 se han asociado a RTT pero también, con menor frecuencia, a otras formas de afecciones intelectuales como autismo, esquizofrenia, retraso mental, síndrome de Angelman y síndrome de duplicación de MeCP2 en varones<sup>27</sup>. Esto sugiere que MeCP2 es una proteína esencial en el desarrollo del cerebro y que tanto sus niveles como su funcionamiento deben mantenerse estrictamente regulados.

### Síndrome de Rett en varones

Inicialmente se creía que RTT sólo ocurría en mujeres. Sin embargo, con la identificación de hombres con RTT clásico y con el descubrimiento del gen causante de la enfermedad, esta idea fue dejada de lado. De esta manera, se pudo determinar que mutaciones en el gen de MeCP2 en varones causan una serie de trastornos que van desde retraso mental hasta encefalopatías graves<sup>3</sup>. Varones con mutaciones en MeCP2 pueden sobrevivir inclusive después de su nacimiento, pero dado que poseen una sola copia del gen, desarrollan fenotipos patológicos más severos que los observados en mujeres con el mismo defecto genético<sup>7</sup>. Así, mutaciones que en mujeres causan RTT clásico, en varones con cariotipo normal, llevan a encefalopatías neonatales y muerte dentro del primer año de vida. Lo mismo, mutaciones en MeCP2 que no causan RTT en mujeres pueden generar

retraso mental moderado o severo, o trastornos psiquiátricos en varones, pudiendo estar acompañados por déficits de lenguaje y motrices, rasgos autistas y epilepsia<sup>3</sup>.

### **MeCP2: METHYL-CpG BINDING PROTEIN**

---

MeCP2 es una proteína nuclear básica que forma parte de una familia de proteínas que se unen al ADN de manera selectiva en residuos metil-citosina en dinucleótidos CpG simétricamente posicionados<sup>3</sup>. Todas las proteínas de esta familia poseen el dominio MBD (dominio de unión a regiones metiladas) altamente conservado lo cual, para MeCP2, es suficiente para unirse al ADN<sup>7</sup>. MeCP2 se expresa en todos los vertebrados y está altamente conservada en los mamíferos<sup>28</sup>. Esta proteína se expresa en una gran variedad de tejidos siendo en el cerebro donde más abunda. MeCP2 tiene un peso molecular aproximado de 53 kDa pudiéndose identificar también por Western Blot a 75 kDa debido a las varias modificaciones post-traduccionales que puede sufrir<sup>29</sup>.

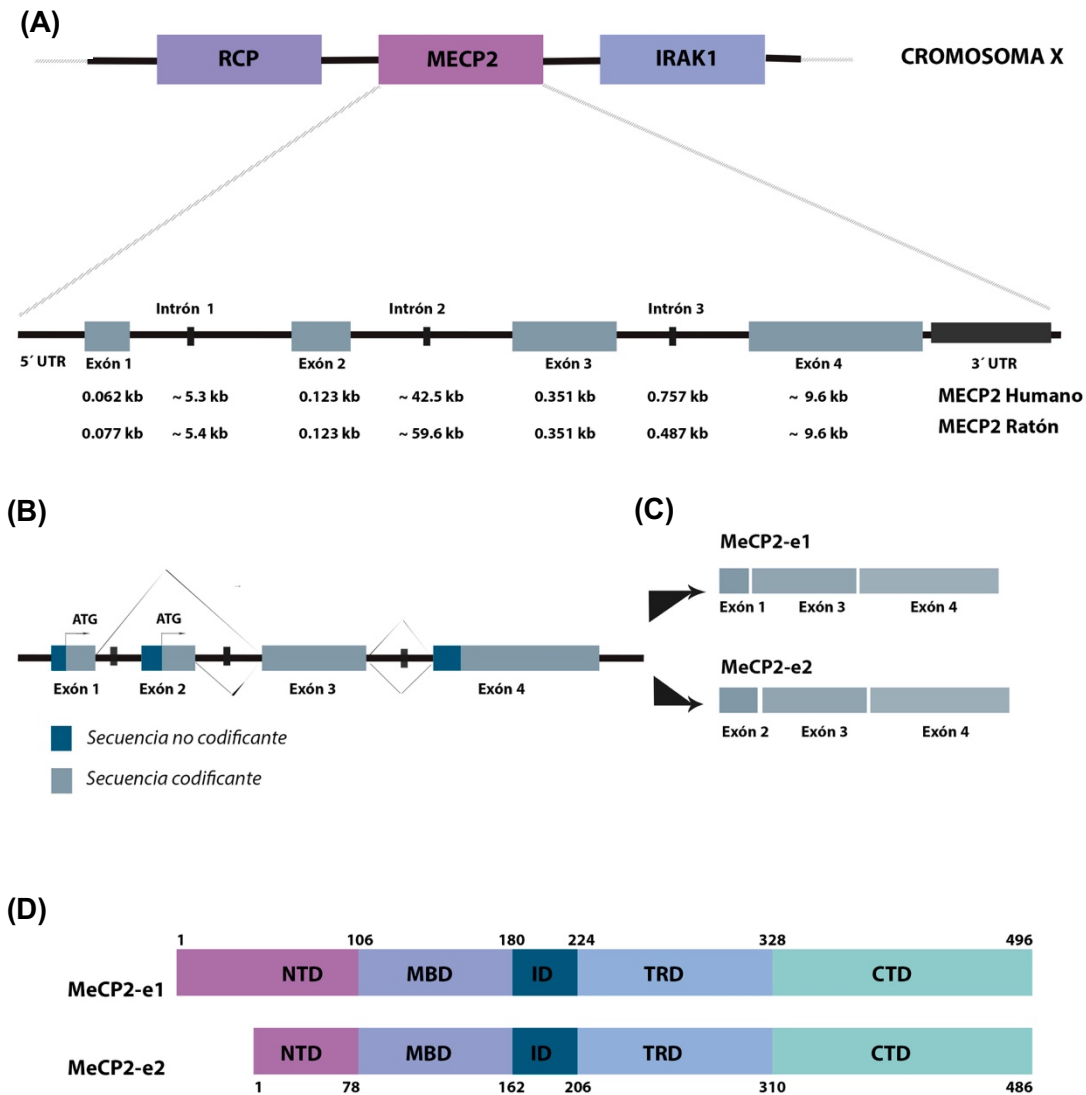
### Estructura de MeCP2

En humanos, el gen de MeCP2 se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq28) y se extiende por aproximadamente 10 kilobases<sup>30</sup>. En humanos y ratones MECP2/MeCP2 consiste en cuatro exones (exón 1-4) y tres intrones (intrón 1-3)<sup>30</sup> (**Figura 2.A**). Debido al *splicing* alternativo, MeCP2 se presenta en dos isoformas MeCP2-e1 y MeCP2-e2, ambas nucleares<sup>3</sup>. La diferencia entre ellas es que MeCP2-e1 usa ATG en el exón 1 como sitio de inicio de traducción, estando compuesto por los exones 1,3 y 4. Por otro lado, la isoforma MeCP2-e2, usa ATG en el exón 2 y comprende los exones 2, 3 y 4<sup>31</sup> (**Figura 2.B**). A pesar de no presentar diferencias funcionales entre ambas isoformas, la isoforma MeCP2-e1 es la dominante en el tejido cerebral representando un 90% del total de MeCP2 en el sistema nervioso y posee una vida media de 4 horas, mientras que para la isoforma e2 es de 100 horas<sup>29,32</sup>.

Desde el punto de vista de la estructura primaria, es idéntica en ambas isoformas y en general, es altamente conservada entre los vertebrados<sup>27</sup>. En cuanto a su estructura secundaria y terciaria, MeCP2 se organiza en 5 dominios principales: el dominio N-terminal (NTD), el sitio de unión a regiones metiladas (MBD), un interdominio (ID), el dominio de represión de la transcripción (TRD) y el dominio C-terminal (CTD). Los dominios NTD, ID y TRD facilitan la unión de MBD al ADN. Hasta el momento, se sabe que casi más de la mitad de las mutaciones *sin sentido* que se conocen en desórdenes asociados a MeCP2, afectan el dominio MBD, denotando así la importancia funcional del mismo<sup>27</sup>. Las dos isoformas de

MeCP2 comparten los dominios MBD, TRD y CTD, pero difieren en su N-terminal (**Figura 2.C**).

MeCP2 se reconoce como una proteína desestructurada o desordenada, ya que el MBD es el único dominio con una estructura terciaria bien caracterizada<sup>27,33</sup>. Se cree que tal estructura desordenada y la variedad de modificaciones post-traduccionales que sufre, son la base de la versatilidad en sus funciones.



**Figura 2. Estructura del gen y proteína MeCP2.** (A) El gen que codifica a MeCP2 se encuentra en el cromosoma X (Xq28), flanqueado por los genes RCP e IRAK. (B) El gen se compone de cuatro exones y tres intrones. Los tamaños de cada región correspondiente a los exones e intrones en humanos y ratón están indicados en la figura. (C) Existen dos isoformas de MeCP2: MeCP2-e1 y MeCP2-e2. Se puede identificar el comienzo de la traducción para cada isoforma indicado por las flechas, ya sea en el exón 1 o 2 en el sitio ATG. (D) Estructura de la proteína MeCP2-e1 y -e2 en humano. El dominio N-terminal (NTD), el sitio de unión a regiones metiladas (MBD), un interdominio (ID), el dominio de represión de la transcripción (TRD) y el dominio C-terminal (CTD)<sup>31</sup>.

### Expresión y localización de MeCP2

Estudios en ratones y humanos han mostrado que la expresión de MeCP2 es alta en cerebro, pulmón y bazo, más baja en corazón y riñón, y casi indetectable en hígado, estómago e intestino delgado<sup>34</sup>.

Existe una sincronización de la expresión de MeCP2 con la ontogenia del SNC. La expresión de MeCP2 sigue temporalmente un patrón similar tanto en ratón como humano, mostrando una expresión temprana en médula espinal y tronco encefálico, y tardía en áreas como el hipocampo y la corteza cerebral<sup>34</sup>. Durante el desarrollo, la expresión de MeCP2 es baja o ausente en neuronas inmaduras, astrocitos y oligodendrocitos<sup>35</sup> y la falta de expresión no afecta la proliferación o diferenciación de las células precursoras<sup>36</sup>. A medida que continúa la maduración neuronal, su expresión aumenta hasta alcanzar un máximo que se mantiene durante toda la vida<sup>37</sup>. MeCP2 aparece por primera vez entre las semanas 10 y 14 de gestación en el tallo cerebral y en neuronas de la corteza cerebral en humanos. A partir de la semana 35 de gestación la expresión de MeCP2 se expande hacia el cerebro anterior, lo que explica potencialmente porque MeCP2 no estaría interviniendo en la proliferación y migración neuronal a nivel cortical. Luego del nacimiento, MeCP2 aumenta significativamente en el prosencéfalo y hacia los 10 años de edad<sup>8</sup>.

De acuerdo a la región del cerebro, los niveles de expresión y la distribución de MeCP2 puede variar. Por ejemplo, la corteza y el cerebelo son los sitios donde los niveles de MeCP2 son los más altos<sup>38</sup>. La expresión diferencial y específica que MeCP2 tiene en el cerebro, define las implicancias en el fenotipo de RTT; así diversos deterioros en la conducta observada en modelo de ratones se correlacionan con los niveles de expresión de MeCP2 en diferentes regiones en el cerebro<sup>39</sup>. MeCP2 se expresa principalmente en neuronas post-migratorias maduras<sup>40</sup> pero también se ha visto que se expresa en otros tipos celulares tales como astrocitos, oligodendrocitos y microglia<sup>41-43</sup>.

### Modificaciones post traduccionales de MeCP2

La proteína MeCP2 se caracteriza por sufrir modificaciones post-traduccionales (MPT), las cuales son importantes para su función y estabilidad<sup>31</sup>. El estudio de las MPT adquirieron relevancia con el tiempo ya que MeCP2 cumple su función como regulador génico global de manera dependiente de actividad en neuronas, cambiando tanto su asociación a co-reguladores como su mecanismo de acción<sup>44</sup>. Entre las distintas MPT se encuentran la fosforilación, SUMOilación, acetilación y ubiquitinación.

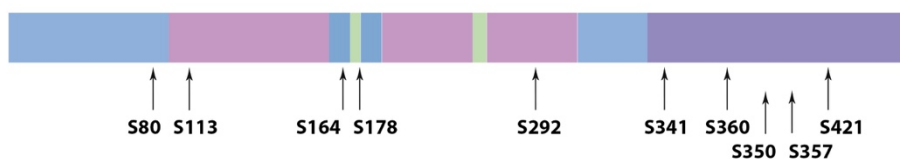
Dentro de las MPT, la más estudiadas son las fosforilaciones. Al respecto, Chen y colaboradores (2003) demostraron que la actividad neuronal dispara la fosforilación

dependiente de calcio de MeCP2, con la consecuente liberación de MeCP2 del promotor del gen *bdnf*, que codifica para el factor de crecimiento neural BDNF, facilitando su transcripción. El residuo involucrado en este mecanismo es el de Serina 421, cuya fosforilación ocurre específicamente en neuronas<sup>45</sup>. Se pudo demostrar en cultivos de neuronas primarias que cuando MeCP2 expresa un sitio S421 que no puede ser fosforilado, el crecimiento dendrítico se ve afectado<sup>46</sup>. Este sitio de fosforilación además está involucrado en la sensibilidad a drogas, modulación del humor y algunas funciones cognitivas<sup>44</sup>. Recientemente un nuevo modelo *knock-in* que imita la fosforilación S421 de MeCP2 fue generado y se han encontrado diferencias con respecto al modelo antes descrito a nivel sináptico (*scaling* sináptico<sup>c</sup> y sinaptogénesis) y comportamental<sup>47</sup>. Estos antecedentes remarcan la importancia funcional de la fosforilación específica de MeCP2 y sugiere que los fenotipos comportamentales y sinápticos son modulados por la presencia o ausencia de eventos de fosforilación. Al analizar la fosforilación de MeCP2 en cerebros de ratas, ratones y humanos, se encontró que la fosforilación del sitio S80 (ubicado en el MBD) aparece como el más conservado y abundante en condiciones de reposo, mientras que la activación neuronal induce la defosforilación, sin afectar la localización subcelular de MeCP2<sup>48</sup>. Por su parte, ratones *knock-in* MeCP2<sup>S80/y</sup> muestran hipoactividad y sobrepeso<sup>48</sup>. Otro sitio de fosforilación estudiado es el sitio T308, ubicado en el CTD. Se ha visto que la fosforilación en este sitio suprime la interacción de MeCP2 con el complejo co-represor NCoR<sup>49</sup>. Esta mutación ha tomado por su cercanía al residuo R306, siendo la mutación R306C/H una de las más frecuentes en pacientes con RTT. Esta mutación evita que MeCP2 pueda interactuar con el complejo co-represor NCoR, tal como lo hace la fosforilación en el residuo T308<sup>49</sup>. En total se conocen hasta el momento 25 sitios de fosforilación, siendo las descritas anteriormente las más estudiadas.

La acetilación es otra MPT que, en MeCP2, permite modular su unión a promotores de genes blancos. En la proteína de humanos, MeCP2 está acetilada en la lisina 461<sup>50</sup>. En cuanto a la SUMOilación, es una modificación que regula el transporte nuclear de proteínas y para MeCP2 también se reportó la SUMOilación en citoplasma<sup>51</sup>. Se especula que esta MPT podría estar involucrada en la estabilidad de MeCP2 y su interacción con proteínas como las histonas deacetilasas (HDAC). Por último, la ubiquitinación de proteínas participa en el control de la señalización intracelular y la degradación proteolítica. Se conocen aproximadamente 10 sitios de ubiquitinación en MeCP2, aunque se desconocen sus roles funcionales. Se cree que estarían involucrados en regular la estabilidad o la degradación de la proteína<sup>31</sup>.

<sup>c</sup> *Scaling* sináptico: forma de homeostasis sináptica que implica un proceso de retroalimentación negativa mediante el cual las neuronas se ajustan o escalan su fuerza post-sináptica en toda su población de sinapsis para compensar el aumento o la disminución de "entrada" o input, evitando así la hiper o hipo actividad neuronal<sup>284</sup>.





**Figura 3. Sitios de Fosforilación en MeCP2.** Los dominios de la proteína se observan en distintos colores y se muestran los diferentes sitios de fosforilación descritos hasta el momento<sup>52</sup>.

### Función de MeCP2

#### ◆ A nivel molecular

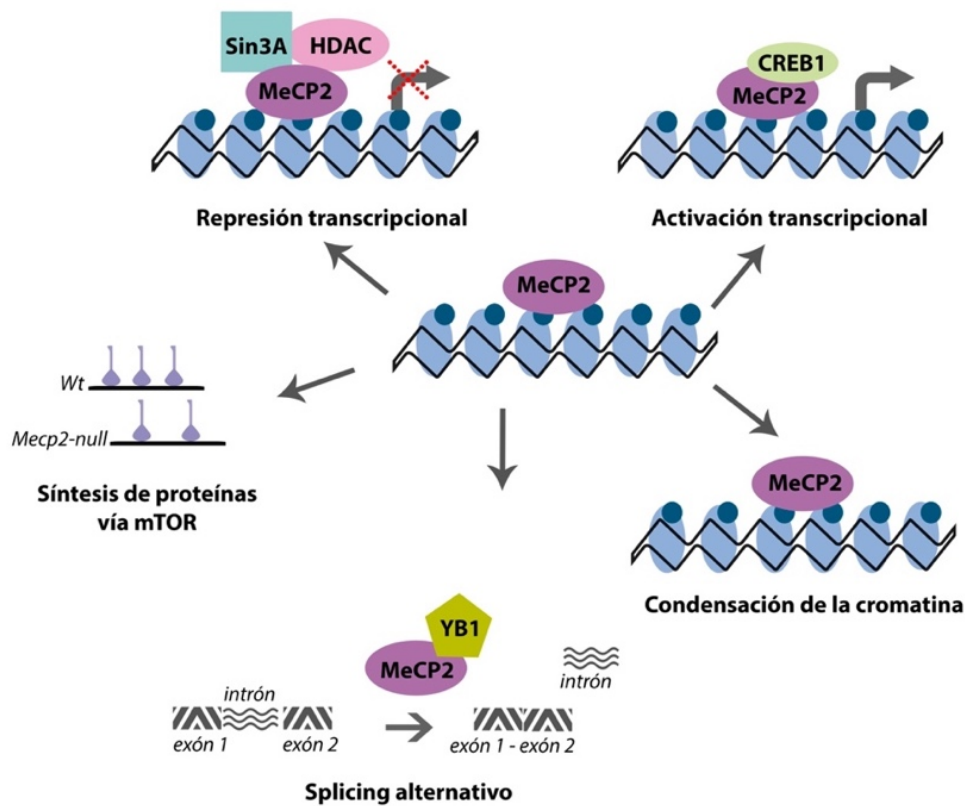
Antes de conocer que mutaciones en MeCP2 eran la base genética de RTT, ya se había caracterizado como una proteína capaz de interactuar con citosinas metiladas seguidas de una guanina a través de su MBD. Una vez que MeCP2 se une al ADN, podría cambiar la estructura de la cromatina. Como se dijo anteriormente, MeCP2 se reconoce como una proteína intrínsecamente desordenada, más del 60% de su estructura no ha sido caracterizada. Como consecuencia, MeCP2 podría adquirir estructuras secundarias al unirse a otras macromoléculas, siendo capaz de interacciones proteína-proteína y de entrar en una asociación estable con sus cofactores cuando se halla unida al ADN<sup>44</sup>.

MBD puede unirse a citosinas metiladas (5mC) pero, estudiando la estructura de MBD a través de rayos X, se ha visto que también se une a la 5-hidroximetil citosina (5hmC) reconociendo así la hidroxilación en lugar de la metilación en la citosina<sup>53</sup>. Esta propiedad es única en MeCP2 ya que no se ha observado en otros miembros de la familia MBD.

Una de las primeras funciones que se le atribuyeron a MeCP2 es la de reprimir la transcripción a través su dominio TRD. Frecuentemente su actividad represora se asocia a la compactación de la cromatina ya que el dominio TRD puede unirse a complejos de co-represores como Sin3A y NCoR que contienen la histona deacetilasa 1 (HDAC1) y HDAC2<sup>30</sup>. Estas enzimas remodelan la cromatina y evitan que la maquinaria transcripcional pueda acceder<sup>54</sup>.

Se ha reportado que MeCP2 también podría actuar como un activador de la transcripción, ya que la ausencia de MeCP2 se ha correlacionado con una disminución en la expresión de varios genes<sup>55</sup>. Según este modelo, MeCP2 activaría la transcripción al reclutar a CREB1 para dirigirse a promotores de genes blancos. Además, se ha visto que la vía de señalización AKT/mTOR se reduce cuando MeCP2 no se expresa, siendo una vía de gran relevancia como moduladora de la síntesis de proteínas<sup>27</sup>.

Nuevos modelos funcionales de MeCP2 establecen que regula la estructura de la cromatina, al actuar como un potente factor de condensación de la misma, de manera directa, sin co-represores o enzimas<sup>23</sup>. Tal función se lograría a través de interacciones reguladoras de gran alcance, formación de bucles de cromatina y puentes de ADN<sup>31</sup>. También puede modificar la estructura de la cromatina al interactuar con complejos remodeladores como ATRX y Brahma. Asimismo, se ha demostrado que MeCP2 participa en el proceso de *splicing* alternativo a través de interacciones con la proteína *Y-box binding protein* (YB1) y en el procesamiento de micro-RNA<sup>56,57</sup> (**Figura 4**).



**Figura 4. Modelos funcionales de MeCP2.** MeCP2 es una proteína multifuncional que participa en distintos procesos como la represión de la transcripción al interactuar con co-represores como Sin3A y HDAC, activación de la transcripción al asociarse a la proteína CREB1. También participa en modificaciones en la estructura de la cromatina, el *splicing* alternativo interaccionando con la proteína YB1 y en modular la vía AKT mTOR en la síntesis de proteínas<sup>27,58</sup>.

En resumen, MeCP2 es una proteína multifuncional que participa principalmente regulando la expresión de diversos genes blancos dependiendo del contexto génico, ya sea activando o reprimiendo la transcripción, inclusive de un mismo gen. Su estructura desorganizada constituye la base por la que cumple diversas funciones. Por su parte, la estructura de MBD le otorga a MeCP2 la capacidad única de interactuar con ADN metilado e hidroximetilado. Además, la versatilidad de la funcionalidad de la proteína también es explicada por las posibles modificaciones post-traduccionales que sufre, afectando así su unión al ADN y proteínas asociadas.

Recientemente se ha visto que ratones que expresan una forma de MeCP2 truncada, que carece tanto de las regiones N-terminal y C-terminal (casi la mitad de la proteína nativa), presentan un fenotipo cercano al normal; asimismo, ratones que expresan una proteína MeCP2 truncada más corta, que además carece de un dominio central, sobreviven más de un año y muestran síntomas leves<sup>59</sup>. Estos datos sugieren que a pesar de la conservación evolutiva de la secuencia completa que codifica a MeCP2, sólo los dominios de unión al ADN y su co-represor serían suficientes para evitar defectos tipo RTT.

### ◆ A nivel neuronal

Dada la presencia prevalente de MeCP2 en sistema nervioso, la mayoría de los estudios han sido dirigidos a entender la función de esta proteína en neuronas y en el SNC. Se ha demostrado que la isoforma MeCP2-e1 regularía la complejidad de las ramificaciones dendríticas neuronales<sup>60</sup> mientras que MeCP2-e2 participaría en los primeros eventos de la formación de neuritas<sup>61</sup>. En cuanto a la isoforma MeCP2-e1, se sugiere que es la isoforma relevante para RTT ya que es la principal en el cerebro. De hecho, estudios recientes muestran que animales *knock-out* para MeCP2-e1 muestran defectos fenotípicos similares a los ratones MeCP2-*null*<sup>62</sup>, que carecen de ambas isoformas.

MeCP2 cumple un rol esencial en regular la transcripción génica dependiente de actividad, lo cual es importante para la función neuronal, la maduración y mantenimiento de espinas dendríticas, el guiado axonal y el mantenimiento de conexiones neuronales, y afectando de este modo también el comportamiento<sup>63,64</sup>. Asimismo, MeCP2 participa en diversas formas de plasticidad sináptica, por ejemplo en el *scaling* sináptico, la plasticidad Hebbiana y la potenciación a largo plazo (LTP) en hipocampo<sup>65-72</sup>. La neurotransmisión excitatoria e inhibitoria también se ven alteradas cuando MeCP2 está mutada, lo cual es esencial para la regulación de proteínas sinápticas claves en el mantenimiento de las redes neuronales ya maduras durante el desarrollo postnatal. Por ejemplo, cuando falta MeCP2 los niveles de proteínas sinápticas como CAMKII, receptores AMPA y NMDA<sup>73</sup> también se ven afectados.

Es importante destacar que la re-activación de la expresión de MeCP2 en neuronas post-mitóticas de ratones *MeCP2-null*, revierte varios de los fenotipos patológicos<sup>74,75</sup>. De tal manera, esta habilidad de revertir el fenotipo patológico posterior a la restauración de la expresión de MeCP2 sólo en neuronas, y las severas consecuencias que genera la pérdida total de MeCP2 en el ratón adulto, demuestra que MeCP2 no sería estrictamente un regulador del neurodesarrollo sino más bien, sería esencial para el mantenimiento del funcionamiento neuronal a lo largo de la vida<sup>76</sup>.

### Modelos animales usados para estudiar MeCP2

El desarrollo de modelos animales para estudiar la función de MeCP2, ha constituido una herramienta primordial para el entendimiento de la patología del síndrome de RTT y para desenmascarar el papel de MeCP2 en distintos escenarios. Los modelos animales desarrollados hasta el momento portan delecciones de MeCP2 en todas las células (modelos *MeCP2-null* tales como: *Mecp2tm1.1Bird*, *Mecp2tm1.1Jaenisch*, *Mecp2Stop*), mutaciones truncadas (*Mecp2-308*), o puntuales (*Mecp2tm1.1Coyle*, *Mecp2tm1.1Vnar*, *Mecp2tm1.1Hup*, *Mecp2tm1.1Joez*, *Mecp2tm1.1RSF*). Todos estos modelos recapitulan varias de las características fenotípicas distintivas de pacientes que sufren esta patología: como la disminución de la vida media, las disfunciones motoras y sensoriales, las anormalidades respiratorias, cognitivas y comportamentales, así como los defectos a nivel sináptico.

Inicialmente, el primer problema a la hora de generar un modelo *MeCP2-null* fue la letalidad embrionaria. Esto se superó al reemplazarse los exones 3 y 4 de MeCP2 en células embrionarias con el mismo exón flanqueado por sitios loxP. Ratones homocigotas y heterocigotas resultaron ser fértiles y viables. Durante el desarrollo temprano, la delección de MeCP2 se logró a través del sistema Cre-loxP, bloqueando la expresión de MeCP2 en todo el organismo en el que se cruzaron hembras *MeCP2 lox/lox* con ratones que expresen Cre<sup>77</sup>.

Asimismo, utilizando *gene targeting*, se introdujo una mutación en el gen de MeCP2 de ratón que origina una proteína truncada. En este modelo se incorporó un codón de terminación temprano posterior al codón 308, el cual mantiene las porciones MBD, TRD y la señal de localización nuclear, pero elimina la región C-terminal de la secuencia codificante. Este tipo de mutación genera un fenotipo patológico menos severo que el observado en los modelos *null*, dando lugar a características fenotípicas similares a las que se presentan en pacientes de RTT<sup>67</sup>. Ratones **MeCP2-308** machos muestran un fenotipo neuropatológico progresivo, con un desarrollo normal aparente hasta aproximadamente

las 6 semanas de edad. Presentan un peso corporal normal y son fértiles. Posteriormente desarrollan temblores que empeoran con la edad, llegando a ser evidentes a simple vista luego de los 4 meses de edad. Además, los ratones mutantes llegan a mostrar cifosis a partir de los 5 meses de edad, acompañado de disfunción motora. Pasados los 8 meses de edad también pueden presentar convulsiones, espasmos mioclónicos, ataxia y anomalías respiratorias. Otra característica es la presencia de comportamientos estereotipados, *handwashing* y *handclasp*, los cuales corresponden a rasgos típicos de pacientes con RTT. La mayoría de los ratones MeCP2-308 pueden sobrevivir al menos 1 año. En caso de los ratones hembras heterocigotas, muestran un fenotipo más leve y variable incluso hasta el año de edad<sup>67</sup>.

Además de los modelos descritos anteriormente, se han generado modelos en ratón con alelos condicionales con el fin de silenciar la expresión de MeCP2 en poblaciones celulares particulares, por ejemplo, en neuronas dopaminérgicas o noradrenérgicas (Mecp22loxB; TH-Cre mice), GABAérgicas (Mecp22loxB; Viaat-cre mice) y serotoninérgicas (Mecp22loxB; PET1-Cre mice). Aunque estos modelos resultan importantes a la hora de esclarecer la influencia de MeCP2 en el funcionamiento de neuronas con un determinado fenotipo, no resultan útiles en estudios traslacionales ya que no modelan los perfiles de expresión que muestran los pacientes.

El uso de modelos animales resulta una herramienta clave para comprender el rol de MeCP2 en la patogénesis de RTT; sin embargo, deben considerarse ciertas limitaciones a la hora de interpretar la función de MeCP2, así como su implicancia en RTT. En primer lugar, el uso de ratones machos *MeCP2-null* no representa de manera directa lo observado en pacientes con síndrome de RTT que son, en su gran mayoría, niñas heterocigotas para las mutaciones en MeCP2. A pesar de que RTT afecta principalmente a mujeres, en la mayoría de los estudios animales se utilizan ratones machos a fin de evitar la gran variabilidad fenotípica observada en hembras heterocigotas debido a la inactivación del cromosoma X al azar. Sin embargo, el uso de ratones hembras heterocigotas sería fundamental en estudios traslacionales, focalizados en encontrar posibles terapias para este síndrome ya que la variabilidad en los déficits tipo RTT observados en los ratones hembras reflejarían mejor la heterogeneidad en pacientes.

# CAPITULO 2

## Sistema Inmunológico e Interacciones Neuroinmunes

### EL SISTEMA INMUNE: COMPONENTES Y FUNCIONES

La función fisiológica del sistema inmune es la de actuar como defensa contra distintas injurias y estímulos que alteran la homeostasis del organismo. En términos generales, la inmunidad es un proceso fisiológico complejo que incluye la percepción de cambios en el ambiente y la presencia de sustancias extrañas (llamadas antígenos), con el fin de responder mediante una serie de mecanismos defensivos, permitiendo restituir la homeostasis del individuo. Los mecanismos que conforman las respuestas de defensa, incluyen reacciones tempranas no específicas del **sistema inmune innato**, y respuestas específicas más tardías del **sistema inmune adaptativo**. Los principales componentes del sistema inmune innato incluyen a barreras físicas y químicas (como la piel), células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células *natural killers* (NK), proteínas sanguíneas (miembros del Complemento junto con otros mediadores inmunes) y citoquinas<sup>d</sup> que regulan y coordinan actividades de células inmunes.

Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer estructuras conservadas de patógenos, como los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y

---

<sup>d</sup>Citoquinas o citocinas hace referencia a un grupo proteínas de bajo peso molecular que actúan principalmente como mediadores entre células del sistema inmune.

moléculas en superficie de patógenos (PAMPs) a través de diversos receptores como los receptores tipo Toll (TLR), NOD (NLR), RIG-1 (RLR) y de lecitinas tipo C (CLR)<sup>78</sup> Los principales PAMPs son ácidos nucleicos microbianos, incluyendo ADN (Motivos CpG no metilados), ARN de doble cadena y monocatenario, así como lipoproteínas, glucoproteínas de superficie y componentes de membrana como por ejemplo, lipopolisacárido (LPS) presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas<sup>79</sup>.

Cuando la respuesta inmune innata generada no es suficiente para combatir al antígeno o estímulo que gatilló tal respuesta, se desencadena la respuesta inmune adaptativa que se caracteriza por su especificidad, ya que muestra un amplio repertorio de receptores capaces de reconocer regiones moleculares de estructuras propias y ajenas<sup>80</sup>. Los componentes de la inmunidad adaptativa incluyen a linfocitos y sus productos, células presentadoras de antígenos (células dendríticas o CDs, macrófagos, linfocitos B y microglia en SNC). Además, al responder a una injuria, las llamadas “células de memoria”, desencadenan una respuesta específica rápida con el fin de eliminar un agente extraño. Con las exposiciones sucesivas al mismo agente, las células de memoria aumentan la magnitud de su respuesta con mayor capacidad defensiva, efecto denominado memoria inmunológica<sup>78</sup>.

En resumen, la respuesta inmune innata y adaptativa son parte de un sistema de defensa integrado en el cual numerosas células y moléculas funcionan de manera cooperativa. Hay dos puntos de encuentro entre ambos sistemas<sup>81</sup>. Primero, la respuesta innata a un antígeno estimula la respuesta adaptativa e influencia la naturaleza de ésta. Segundo, las respuestas adaptativas usan muchos de los mecanismos de la inmunidad innata para mantener la homeostasis y responder adecuadamente a injurias<sup>82</sup>.

### Inflamación: componentes celulares y moléculas efectoras

La inflamación es una secuencia compleja de eventos altamente regulados que puede ser provocada por una variedad de estímulos que incluyen patógenos, agentes mecánicos y químicos nocivos, y respuestas autoinmunes<sup>83</sup>. La respuesta inflamatoria se produce en el tejido conectivo vascularizado, incluyendo el plasma, las células circulantes, vasos sanguíneos y componentes celulares y extracelulares<sup>84</sup>. Esto se corresponde con un aumento del calibre microvascular, una mayor permeabilidad vascular, el reclutamiento de leucocitos y la liberación de mediadores inflamatorios<sup>83</sup>. En condiciones fisiológicas, cuando la respuesta inflamatoria es correctamente regulada, protege contra más lesiones y elimina el tejido dañado. Sin embargo, en condiciones patológicas, la inflamación puede resultar en la destrucción del tejido y conducir a la disfunción de los órganos.

La inflamación puede ser aguda o crónica. En el primer caso, se trata de un proceso de duración relativamente corta, de minutos, varias horas, o unos pocos días, y sus principales características son la exudación de proteínas líquidas y plasmáticas (edema) y la emigración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. Por su parte, la inflamación crónica, es de mayor duración y se asocia histológicamente con la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos, la fibrosis y la necrosis del tejido. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria se caracteriza por la movilización e interacción de distintos tipos celulares y moléculas de señalización con el fin de desencadenar una respuesta local y sistémica<sup>85</sup>.

La inflamación incluye distintas etapas desde el inicio, inflamación, resolución y establecimiento de la integridad del tejido<sup>83</sup>. La fase inflamatoria tiene como objetivo eliminar el o los factores que gatillaron la respuesta inmune, ya sea un patógeno, una toxina o un daño propio al tejido<sup>83</sup>. Posteriormente, en una segunda etapa, sigue la eliminación de células moribundas, matriz extracelular dañada y restos celulares<sup>86</sup>. Por su parte, los procesos que modulan e inhiben a la inflamación tienen como objetivo la eliminación o la desactivación de mediadores y células efectoras inflamatorias lo cual permite al huésped reparar los tejidos dañados<sup>87</sup>. Los componentes que participan en la resolución de la inflamación, incluyen una respuesta celular (apoptosis), la formación de mediadores solubles (tales como citoquinas anti-inflamatorias y anti-oxidantes), y la producción de efectores (entre ellos se encuentran los inhibidores de proteasas)<sup>83</sup>.

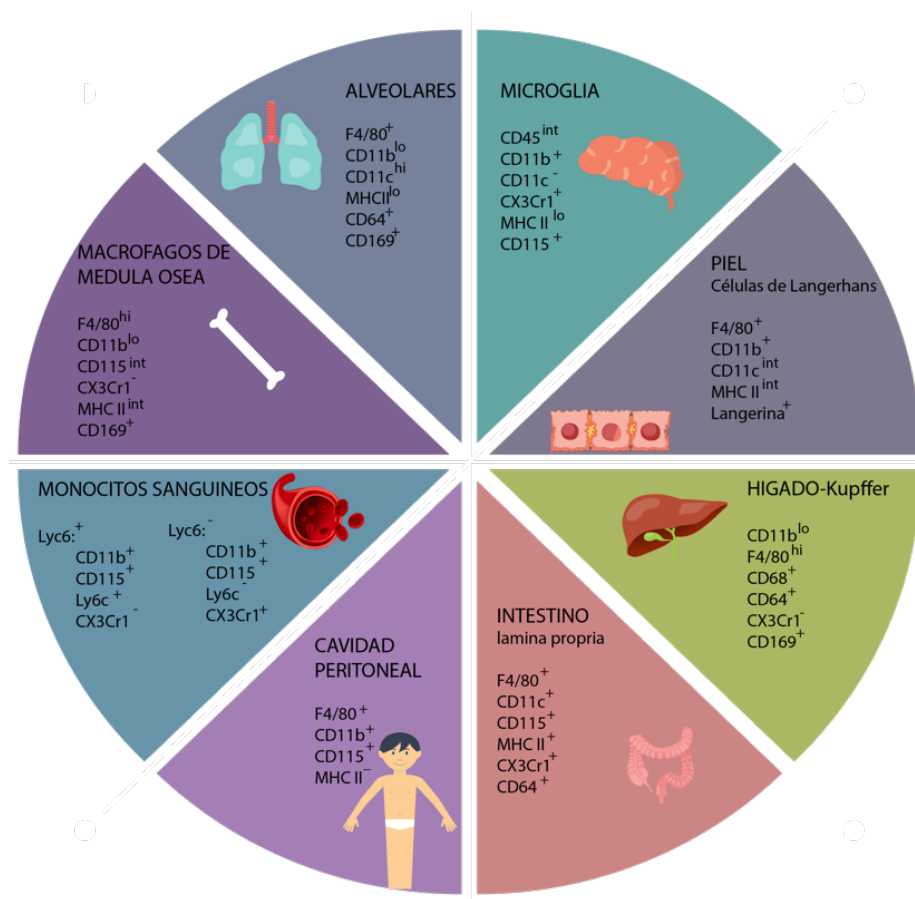
En la actualidad se considera a la inflamación como un factor clave en la patogénesis y/o mantenimiento de diversas enfermedades y desórdenes. Por ende, se han clasificado en: patologías en las que la inflamación cumple un rol central en su patogénesis (por ejemplo, en Alzheimer, psoriasis, Lupus, Asma, Esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, entre otras). En segundo lugar, enfermedades de origen infeccioso en las que la inflamación puede contribuir en gran medida a la patología junto con la toxicidad microbiana (por ejemplo, enfermedad de Chagas, Hepatitis C, Tuberculosis y Neumonitis quística fibrosa). Y por último, aquellas enfermedades de origen diverso en las que la fibrosis post-inflamatoria es una causa principal de la patología (como la Cirrosis hepática o el rechazo alógrafico a injertos)<sup>87</sup>.



### Macrófagos

Los macrófagos se encuentran virtualmente en todos los tejidos de los mamíferos adultos, donde pueden representar hasta el 10-15% del número total de células en condiciones de reposo y aumentan en respuesta a los estímulos inflamatorios<sup>86</sup>. La gran especialización de los macrófagos en microambientes particulares explica su extensa heterogeneidad y versatilidad<sup>86</sup>. Los macrófagos cumplen importantes funciones en el desarrollo tisular, la respuesta a patógenos, y en el mantenimiento de la homeostasis tisular al fagocitar células apoptóticas, remodelar y reparar los tejidos.

Los macrófagos se originan a partir de reservorios de monocitos en sangre, bazo, medula ósea, el saco vitelino y en hígado fetal<sup>86,88</sup>. La población de macrófagos se puede dividir de acuerdo con la localización anatómica y se pueden diferenciar, por ejemplo, los osteoclastos (hueso), los macrófagos alveolares (pulmón), los histiocitos (tejido conectivo intersticial) y las células de Kupffer (hígado), entre otros<sup>89</sup> (**Figura 5**). Además, otras poblaciones de macrófagos se encargan de custodiar sitios inmunoprivilegiados como el SNC, el ojo y los testículos. Existen diversos fenotipos de macrófagos, lo cual es esencial para el mantenimiento de la homeostasis y los mecanismos de defensa del organismo. Estas funciones homeostáticas pueden ser alteradas por una amplificación o respuesta inmune anómala por parte de los macrófagos y, en consecuencia, pueden derivar en condiciones patológicas.



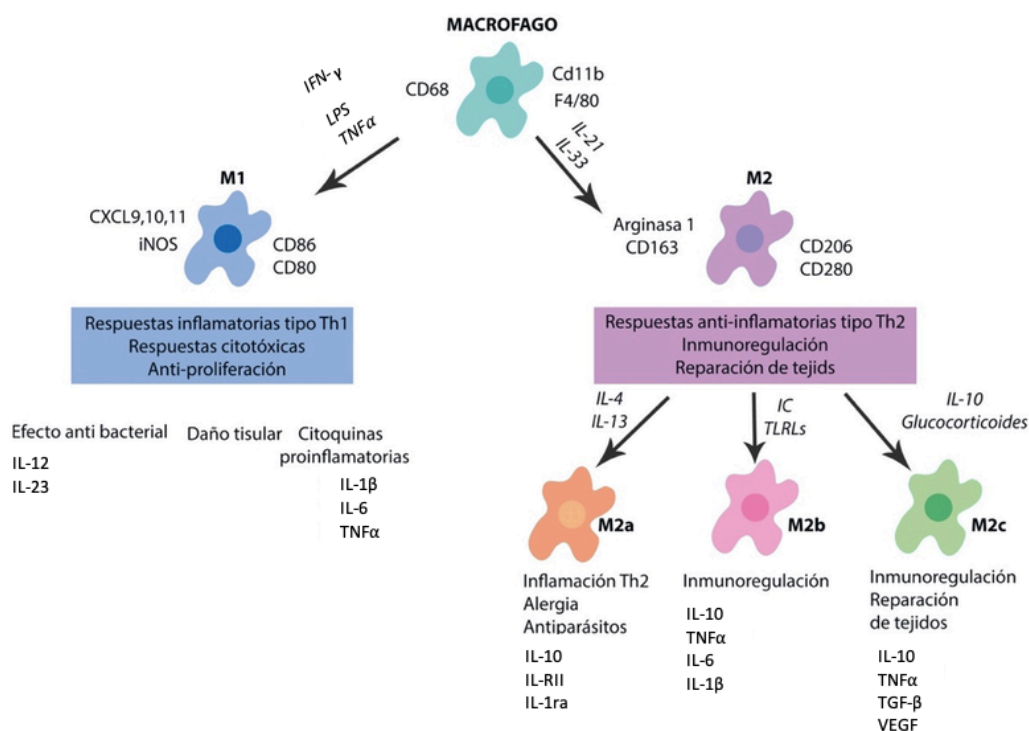
**Figura 5. Heterogeneidad de macrófagos.** Los macrófagos son parte de una población altamente heterogénea y los mismos se pueden identificar de acuerdo con la combinación de marcadores de superficie que incluyen CD45, un marcador de linaje hematopoyético, CD11b, la cual es una integrina, MHC II, entre otros. Además, los macrófagos en diferentes órganos tienen diferentes composiciones y niveles de expresión de estas proteínas de superficie, lo cual refleja su diversidad<sup>89</sup>.

### Vías de activación de macrófagos

La acción coordinada de varios estímulos inflamatorios, moléculas de señalización y factores de transcripción, está involucrada en la polarización de los macrófagos. En respuesta a tales estímulos, como productos microbianos, linfocitos activados o bajo condiciones patológicas, los macrófagos adquieren distintivos fenotipos al polarizarse<sup>90</sup>. La clasificación de macrófagos toma en cuenta tres funciones básicas de estas células para mantener la homeostasis: defensa del hospedador, la reparación de tejidos dañados y la regulación inmune. Clasificando a los macrófagos de acuerdo con estas funciones, se pueden definir tres poblaciones básicas de macrófagos: los activados clásicamente (M1), los de reparación (M2) y los regulatorios<sup>91</sup> (**Figura 6**).

Las señales innatas y adaptativas pueden influir en el fenotipo funcional de los macrófagos, lo cual puede tener consecuencias potencialmente peligrosas si no están

reguladas adecuadamente<sup>92</sup>. Por ejemplo, los macrófagos M1 activados de forma clásica pueden causar daño a los tejidos del huésped, predisponer al tejido circundante a la transformación neoplásica e influir en el metabolismo de la glucosa promoviendo la resistencia a la insulina. Los macrófagos M2, que normalmente están involucrados en la curación de heridas, pueden promover la fibrosis, exacerbar respuestas alérgicas y ser explotados por patógenos para la supervivencia intracelular<sup>93</sup>.



**Figura 6. Fenotipos M1 y M2 de macrófagos.** De acuerdo al estímulo con el que se encuentra un macrófago, estos podrán diferenciarse en M1, M2 (M2a, M2b, M2c). Cada fenotipo se caracteriza por el tipo de marcador de superficie que posea y de los mediadores inmunes que liberan. La respuesta inicial se lleva a cabo por macrófagos activados en modalidad clásica o alternativa (dependiendo de los eventos desencadenantes), con el objetivo de promover la respuesta inflamatoria. Luego, la fase de resolución es llevada a cabo por macrófagos anti-inflamatorios e inmunoreguladores, que no responden a estímulos inflamatorios y activan la eliminación de las células y componentes tisulares dañados, la promoción de la angiogénesis, proliferación celular, deposición de matriz y en general la remodelación tisular. Los mecanismos que explican la desactivación de los macrófagos desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y el mantenimiento de la respuesta inmune bajo control<sup>92</sup>.

**Macrófagos M1 o activados clásicamente**

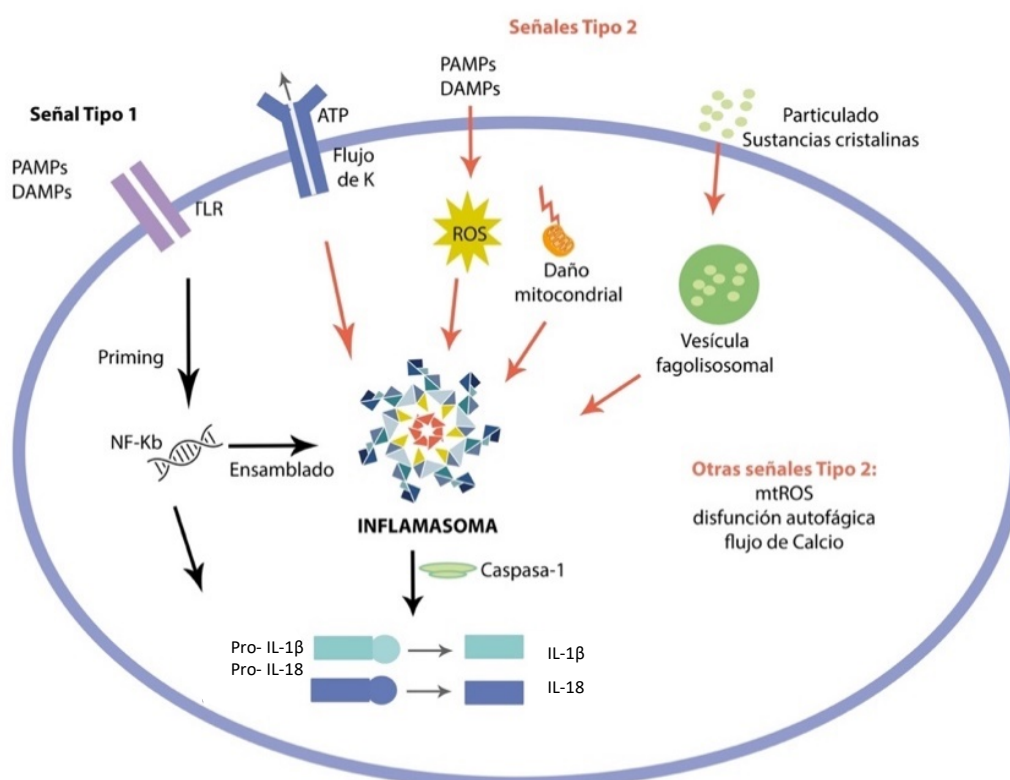
Existen diversos estímulos destinados a polarizar hacia un fenotipo M1 o M2. Los estímulos M1 se agrupan de acuerdo con su habilidad para inducir una típica respuesta inflamatoria. La activación clásica depende de dos señales, la primera es  $IFN\gamma$  y la segunda es generada por PAMPs que actúan a través de los receptores TLR (por ejemplo, LPS)<sup>94</sup>. El  $IFN\gamma$  puede ser producido por células de la inmunidad innata, como las NK al responder a estrés o infecciones. Sin embargo, la producción de  $IFN\gamma$  por NK es una respuesta temprana y requiere, para mantener la población de macrófagos activados, una respuesta del sistema inmune adaptativo para generar una respuesta de defensa estable<sup>94</sup>. La provisión continua de  $IFN\gamma$  está dada por células T con perfil inflamatorio.

El LPS es otra señal bien estudiada en macrófagos M1. El mismo es reconocido por TLR4 o por mecanismos independientes de TLR4 que conducen a la activación de inflamasomas<sup>95</sup>. Éste se trata de un complejo proteico de activación de caspasa-1 u 11, típico de la inmunidad innata, el cual está conformado por un receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NLR), la proteína ASC y la caspasa-1 u 11. Al activarse, se generan caspasas inflamatorias y se procesan formas inmaduras de IL-1 $\beta$  e IL-18 (pro-IL1 $\beta$  y pro-IL18) a una forma activa. Además, se promueve la producción de moléculas efectoras como óxido nítrico (ON), ROS citoplasmático y mitocondrial (**Figura 7**).

Los cambios fisiológicos en macrófagos M1 conducen a la secreción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo,  $IFN-\beta$ , IL-12,  $TNF\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$ ), quimioquinas (por ejemplo, CCL2, CXCL10 y CXCL11), moléculas presentadoras de antígeno (como MHCII), moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y peptidasas<sup>96</sup>. Un mecanismo efector clave es la producción de óxido nítrico (ON), el cual tiene una actividad antimicrobiana directa. Los macrófagos M1 expresan la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) que metaboliza la Arginina en ON y citrulina. El ON se puede metabolizar a especies reactivas de nitrógeno, y la citrulina se puede reutilizar para la síntesis eficiente de ON a través del ciclo de citrulina<sup>97</sup>. Los inductores transcripcionales prototípicos de iNOS incluye a los TLR (a través del reconocimiento de patógenos microbianos y sus productos) e  $IFN\gamma$  o  $IFN$  tipo I, jugando un papel esencial en respuestas M1 mediante la activación de la vía NF- $\kappa$ B y JAK/STAT respectivamente<sup>98</sup>. La producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) conforma también parte de la respuesta M1 y es generado por el complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NAPDH) oxidasa. Una producción continua del  $O_2^-$  ocurre en la mitocondria debido a la fuga de electrones desde la cadena de transporte de electrones. También depende de varias enzimas para su producción, como NAPDH y NOX, las cuales están presentes en todos los tipos celulares. El  $O_2^-$  puede ser removido gracias a acción de la enzima

mitocondrial manganeso superóxido dismutasa<sup>99</sup> y participa activamente en la eliminación de patógenos<sup>100</sup>.

Cuando la polarización M1 no es correctamente modulada puede dañar tejidos y alterar la homeostasis inmunológica. De esta manera, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y citoquinas inflamatorias pueden afectar a otras células y tejidos del organismo. Por ejemplo, se han encontrado en enfermedades autoinmunes, como en esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y orquitis autoinmune, un perfil M1 alterado <sup>101-103</sup>. También se ha relacionado a procesos asociados a inflamación crónica como obesidad y aterosclerosis<sup>104,105</sup>.



**Figura 7. El inflamasoma y sus vías de activación en macrófagos M1.** Tras la exposición a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a peligros (DAMP), los receptores Toll-like (TLR) se fosforilan y posteriormente activan NF-κB. En el núcleo, NF-κB promueve la transcripción de proIL-1β y proIL-18, que, después de la traducción, permanecen en el citoplasma en formas inactivas (Señal tipo 1, de priming). Un estímulo posterior, señal tipo 2, activa el inflamasoma NLRP3 al facilitar la oligomerización de NLRP3 inactiva, la proteína tipo speck asociada a apoptosis (ASC) y procaspasa-1. Este complejo, a su vez, cataliza la conversión de procaspasa-1 en caspasa-1, que contribuye a la producción y secreción de IL-1β e IL-18 maduras<sup>106</sup>.

### **Macrófagos M2 o activados alternativamente**

La clasificación de macrófagos como M2, surge a partir de las observaciones iniciales del efecto de IL-4, debido a su capacidad para antagonizar respuestas inflamatorias y marcadores prototípicos M1, por eso se los llaman activados “alternativamente”<sup>91</sup>. Los macrófagos con perfil M2 participan en procesos alérgicos, eliminación de parásitos, modulación de la inflamación, remodelación de tejidos, angiogénesis, inmunoregulación y promoción de tumores<sup>91</sup>. La modulación de la inflamación se logra a través de la liberación de factores antiinflamatorios como, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , VEGF, EGF, Arginasa-1, para desactivar fenotipos de células pro-inflamatorias y restablecer la homeostasis <sup>107</sup> **(Figura 7)**.

#### ▪ **Macrófagos M2a**

Macrófagos tratados *in-vitro* con IL-4 y o IL-13 se diferencian a macrófagos M2a, los cuales no presentan antígenos a células T, producen cantidades mínimas de citoquinas pro-inflamatorias y son menos eficientes que los macrófagos M1 para producir radicales tóxicos de oxígeno y nitrógeno, y por ende, para matar a patógenos intracelulares<sup>91</sup>. Se trata de una población programada para promover la curación de heridas, la angiogénesis y la reparación de daño tisular en etapas de sanación de enfermedades crónicas y agudas. Por su parte, IL-4 e IL-13, estimulan la expresión de la enzima Arginasa-1 (ARG-1), un marcador típico de la activación alternativa de macrófagos murinos. Esta enzima genera una ruta de utilización de L-arginina a L-ornitina, un precursor de poliaminas y colágeno que contribuye a la producción de matriz extracelular<sup>108</sup>. Durante mucho tiempo se ha tratado de encontrar marcadores específicos de macrófagos activados alternativamente, por ejemplo, la proteína FIZZ1 (“encontrada en zonas inflamatorias”) un miembro de la familia de moléculas tipo resistina, que es secretada cuando macrófagos son estimulados con IL-4 y/o IL-13 y se asocia al metabolismo lipídico y la fibrogénesis <sup>109</sup>.

La activación vía M2 parece tener un origen tanto innato como adaptativo ya que varios tipos celulares producen IL-4 e IL-13, como linfocitos CD4+ Th2, NK, basófilos, mastocitos, eosinófilos<sup>110</sup>. Los macrófagos M2a se caracterizan por su perfil anti-inflamatorio e inmunosupresor ya que se estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-1RA, e inhiben la expresión de IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-12<sup>92</sup> **(Figura 7)**.

#### ▪ **Macrófagos M2c**

El mantenimiento de la homeostasis tisular luego de un proceso inflamatorio es ordenado. Cuando la inflamación llega a su fin, las células que participan son reemplazadas por una población que forma parte activa de la fase de resolución de la inflamación. De esta manera, monocitos migrantes se encuentran con señales que inducen a producir macrófagos con una fisiología diferente a aquellos que poblaron originalmente el foco inflamatorio, los cuales son llamados macrófagos M2c<sup>111</sup>. Algunos componentes del microambiente que

pueden inducir este tipo de fenotipo son los glucocorticoides, citoquinas anti-inflamatorias (IL-10), derivados de prostaglandinas y factores de crecimiento (TGF- $\beta$ )<sup>111</sup>.

Entre sus funciones, se encargan de disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, activar la eliminación de restos celulares y el programa pro-sanación. La citoquina IL-10 es producida por macrófagos, células T y B, mastocitos, queratinocitos, como parte de una respuesta homeostática. Esta citoquina limita la duración e intensidad de reacciones inmunes e inflamatorias. Por su parte, TGF- $\beta$  es una citoquina pleiotrópica y en macrófagos inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducidos por LPS<sup>92</sup>. Por último, los glucocorticoides, se liberan en respuesta a una variedad de estresores, lo cual hace que sean esenciales para el mantenimiento de las funciones homeostáticas ya que, al igual que IL-10 y TGF- $\beta$ , regula la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la producción de mediadores inflamatorios como el ON. Además, los glucocorticoides regulan negativamente una gran variedad de genes que activan el aumento de IFN $\gamma$ , quimioquinas como CXCL10 y el receptor de quimioquinas CX<sub>3</sub>CR1<sup>93</sup> (**Figura 7**).

- **Macrófagos M2b**

Una tercera población de macrófagos fue descrita por primera vez por Mosser, la cual surge al estimular macrófagos con LPS o IL-1 $\beta$ , a través de TLR4 o IL-1R y complejos inmunes reconocidos por los receptores para el Fc de la Inmunoglobulina G, IgG. Estos macrófagos se caracterizan por producir bajas cantidades de IL-12 y altas de IL-10, lo cual favorece a respuestas inmunes tipo 2 y adaptativas<sup>112</sup>. Los macrófagos M2b son claramente distintos a los M2a ya que producen niveles de IL-10 mucho más altos y cantidades significativamente mayores de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6, lo que indica que estas células no serían anti-inflamatorias *per se*<sup>93</sup>. En este sentido, se ha demostrado que hay una mayor similitud entre la activación M2b y M1 que entre M2a y M2b. Aunque el perfil de citoquinas que liberan difiere entre los macrófagos M2b y M1, ambos producen altos niveles de ON y expresan baja actividad de la ARG-1. En macrófagos M2b se ha identificado un patrón único de quimioquinas caracterizada por la expresión de CCL1, que cuando es liberada, atrae células CD4<sup>+</sup> Th2, T regulatorias (Ver siguiente sección: diversidad células T) y eosinófilos<sup>108</sup>. Se ha considerado el uso potencial de macrófagos M2b en terapias para enfermedades en las cuales la supresión de citoquinas inflamatorias por citoquinas inmunoregulatoras como IL-10 podrían atenuar la patología<sup>113</sup> (**Figura 7**).

### Componentes de la inmunidad adaptativa

Los linfocitos son las principales células en la respuesta inmune adaptativa y se agrupan en dos poblaciones, los B y los T. Los linfocitos B participan de la inmunidad humoral. Éstos reconocen antígenos directamente a través de sus receptores en la membrana celular. Una vez que las células B se activan, proliferan y se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos que median respuestas destinadas a neutralizar antígenos.

En la inmunidad mediada por células, los principales protagonistas son las células T, que se pueden dividir en dos subpoblaciones: las células T CD8+ (citotóxicas) y las T CD4+ (*T helper*). Por su parte, células T CD4+ activan macrófagos para que destruyan microbios fagocitados y las células T CD8+ se encargan de matar células infectadas con microbios intracelulares, activando la apoptosis<sup>79</sup>. Frente a los múltiples patógenos y estímulos inmunes, las células no diferenciadas llamadas células T CD4+ *naive* o vírgenes, organizan distintas respuestas inmunes al diferenciarse en células T *helper* o colaboradoras (Th). Estas secretan citoquinas y adaptan sus respuestas de acuerdo con al estímulo o patógeno a enfrentar. Se encargan de la activación y direccionamiento de otras células ya que proporcionan ayuda a los linfocitos B para la posterior producción y liberación de anticuerpos, activan y favorecen a expandir la población de células T citotóxicas CD8+, y activan células del sistema inmune innato con actividad fagocítica, como los macrófagos<sup>90</sup>. El receptor de células T (TCR por *T cell receptor*) reconoce sólo péptidos cortos. Estos se forman por proteólisis de proteínas extrañas y se presentan a las células T en asociación con moléculas MHC de clase I o clase II, que están presentes en la membrana celular de células presentadoras de antígeno (CPA)<sup>114,115</sup>. Casi todas las células somáticas tienen moléculas MHC clase I. Estas permiten que las células infectadas o transformadas sean reconocidas y destruidas por las células T citotóxicas. Sin embargo, las moléculas MHC clase II, se encuentran solo en las CPA profesionales<sup>116,117</sup>. Entre las CPA profesionales se encuentran las células dendríticas, macrófagos y células B. Las células CD4 se asocian a antígenos presentados en el contexto de MHC II, mientras que las CD8 reconocen antígenos asociados a MHC I. Este reconocimiento restringe el rango de antígenos presentados a las células CD4 o CD8<sup>118</sup>.

Estimular una célula T con un determinado antígeno no necesariamente lleva a la activación de ésta, sino que en ciertas condiciones puede producir una célula T refractaria a un estímulo adicional, estado conocido como anergia<sup>119</sup>. Esto es relevante ya que las interacciones de las células T con un antígeno específico en CPA en reposo dan como resultado anergia e inmunotolerancia, un proceso que parece ser responsable de eliminar las células T autorreactivas a antígenos expresados sólo en la periferia y de ese modo prevenir la autoinmunidad. Así, durante la activación de células T se requiere de



señales co-estimuladoras<sup>119</sup>. Primero, las CPA captan y procesan antígenos del medio y migran hacia los órganos linfáticos secundarios más cercanos, como bazo y nódulos linfáticos. En ellos maduran, es decir, aumentan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), asociadas a pequeños péptidos del patógeno, y moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40), junto con la secreción de mediadores pro- y anti-inflamatorios<sup>117</sup>. En este sentido, cuando una CPA se activa al detectar patógenos o inflamación a través de uno o más receptores de reconocimiento de patrones innatos o citoquinas, los diversos ligandos co-estimuladores también se expresan, induciendo la activación, proliferación y diferenciación de las células T. Por lo tanto, la producción de señales inflamatorias innatas y mediadores es un preludio necesario para la transición efectiva de una respuesta innata a una adaptativa<sup>120</sup>.

#### Diversidad fenotípica de linfocitos T CD4+

En respuesta al ambiente específico dado por las citoquinas, los niveles de expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras presentes en la superficie celular de las CPA, las células T estimuladas con antígenos se programarán genéticamente en una variedad de subconjuntos que poseen mecanismos efectivos apropiados para eliminar el patógeno.

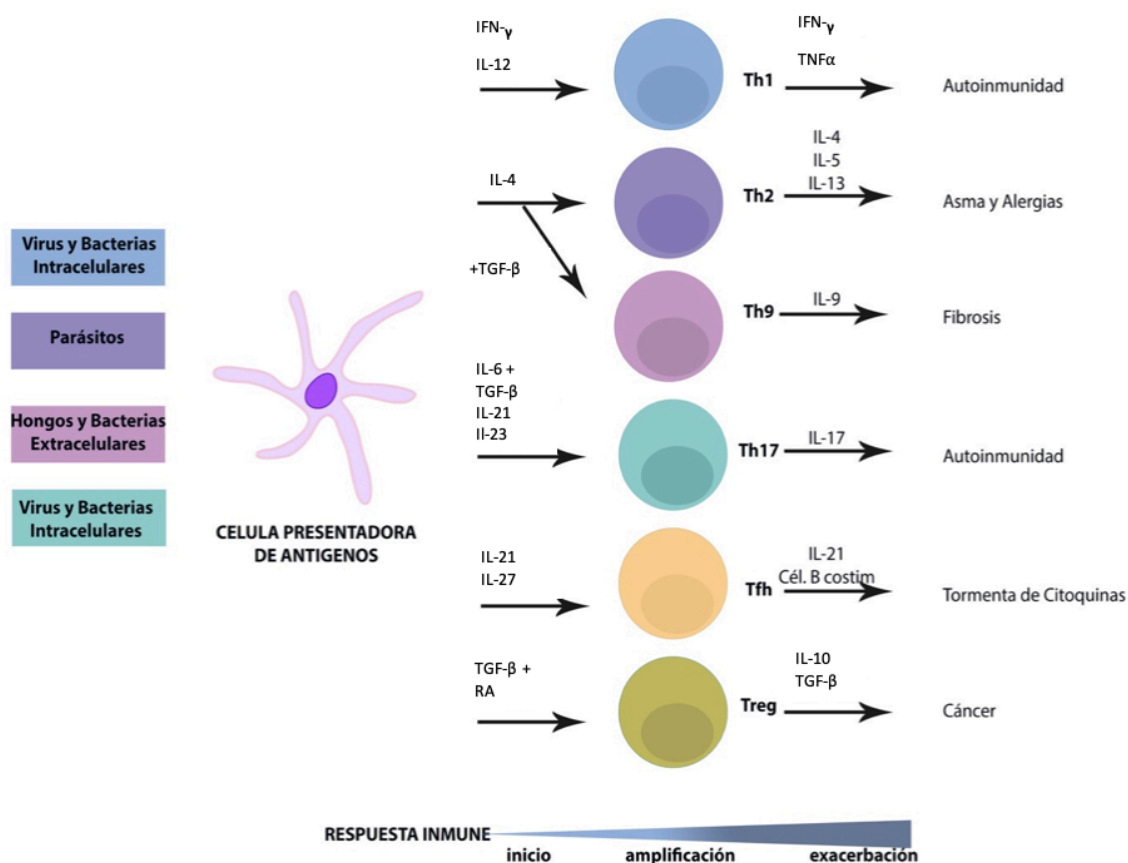
Se han identificado diversos tipos de células T colaboradoras de acuerdo con sus respuestas y se han caracterizado, además, los factores de transcripción o reguladores maestros de cada linaje. Se han clasificado de acuerdo al orden histórico en que fueron descubiertas (Th1, Th2), tipo de citoquina que secretan (como el grupo Th17, Th9), su importancia biológica (Tfh ayudante folicular), o su importancia funcional (Treg, células T reguladoras)<sup>119</sup>. El repertorio de la diferenciación de células T se ilustra en la **Figura 8**.

La producción de IFN $\gamma$  e IL-12 en respuesta a un patógeno intracelular, induce la expresión del factor de transcripción T-bet y promueve la diferenciación a células **Th1**. Esta subpoblación se caracteriza por la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , las cuales se retroalimentan activando células vecinas, como macrófagos, con el fin de potenciar su capacidad de presentadora de antígenos y fagocítica<sup>121</sup>. Cuando las células T vírgenes o *naïve* se activan en presencia de IL-4, éstas se diferencian en células **Th2**, las cuales son importantes para eliminar microorganismos extracelulares y parásitos<sup>121</sup>. Esta subpoblación genera grandes cantidades de IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citoquinas propagan y activan eosinófilos, mastocitos y basófilos especializados para eliminar parásitos y promueven que las células B produzcan isotipos de anticuerpos específicos de antígenos, que circulan a las superficies de las mucosas y neutralizan las futuras amenazas de encuentros parasitarios. Interacciones con otros

parásitos que generan ambientes ricos en IL-4 y TGF- $\beta$ , generan un subconjunto similar pero que liberan IL-9, de allí que se llamen **Th9**<sup>118</sup>. Ambos subconjuntos Th2 y Th9 logran sus características únicas a través de la regulación de genes activados por el factor de transcripción GATA-3<sup>121</sup>. Sin embargo, una respuesta Th2 o Th9 robusta o desmedida, puede desencadenar patologías como alergias y asma<sup>118</sup>.

En respuesta a bacterias y hongos extracelulares, las células inmunes innatas generan grandes cantidades de TGF- $\beta$  e IL-6. Cuando las células T *naive* reciben estas señales con estimulación adicional y sostenida de IL-21 e IL-23, se convierten en células **Th17** bajo el control diferencial de un factor de transcripción llamado ROR- $\gamma$ <sup>119</sup>. Se han dilucidado distintas funciones para Th1 y Th17 en múltiples afecciones autoinmunes en humanos como diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple<sup>122,123</sup> (Ver capítulo 3 de la introducción). Con el fin de evitar respuestas inmunes persistentes y exacerbadas con potencial inmunopatológico, el sistema inmune produce un subconjunto de células T, las T regulatorias o **Treg**, que frenan procesos inflamatorios. La actividad supresora de las Treg esta mediada por el factor de transcripción FoxP3. Esta subpoblación de células T colaboradoras evitan la proliferación de células T y la producción de citoquinas pro-inflamatorias al producir citoquinas supresoras como IL-10, TGF- $\beta$  o IL-35. Aunque estas citoquinas son esenciales para mantener la tolerancia inmune, muchos estudios muestran que Tregs pueden adquirir la capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias, y tal circunstancia puede exacerbarse durante procesos autoinmunes. De hecho, existe una cierta flexibilidad en la expresión de reguladores maestros de cada linaje así como de las citoquinas que liberan<sup>90</sup>.

Por ultimo, las células **Tfh**, colaboradora folicular, ayudan a las células B a producir anticuerpos en respuesta a los antígenos dependientes de células T. Aunque todavía no queda claro si la las Tfh son verdaderamente una subpoblación de las T colaboradoras o un estado particular de las otras subpoblaciones, éstas ayudan en el desarrollo de centros germinales y la recombinación del cambio de clase de inmunoglobulinas. Su factor regulador de la transcripción es Bcl6, un represor transcripcional<sup>121</sup>.



**Figura 8. Diferenciación de células T CD4+.** Células presentadoras de antígenos reconocen a un amplio rango de patógenos lo que da como resultado la liberación de citoquinas. Junto con los TCR, las citoquinas modulan la diferenciación de las células T vírgenes programadas por factores de transcripción para responder de manera específica al tipo de patógeno. Células activadas responden produciendo citoquinas que retroalimentan el medio celular, amplifican la señal y ayudan a promover la eliminación de patógenos. Sin embargo, cuando respuestas T resultan exacerbadas o sostenidas, pueden desencadenarse diversas inmunopatologías que van desde la autoinmunidad, alergia, asma, tormenta de citoquinas y cáncer. Los colores de cada grupo de patógenos se corresponden con los colores de los tipos de células T que responden específicamente a cada uno de ellos <sup>90,119</sup>.

### **EL EJE NEUROINMUNE**

---

El sistema nervioso y el inmune son los principales sistemas sensores del organismo ya que perciben, integran y responden a distintos estímulos. Tienen la capacidad de recordar eventos pasados y adaptarse eficientemente a condiciones cambiantes. Las funciones de ambos sistemas dependen de contactos célula- célula y moléculas solubles que actúan como mensajeros a cortas o largas distancias. Entre tales moléculas se incluyen las citoquinas, quimioquinas, neuropéptidos y neurotrofinas. Las similitudes entre ambos sistemas han dado lugar a la idea que los sistemas nervioso e inmune estarían relacionados evolutivamente a través de un precursor ancestral común. Desde una interpretación evolutiva, es probable que la acción concertada entre ambos sistemas, significó una mejoría en la integridad de tejidos, órganos y organismos<sup>85</sup>.

Durante mucho tiempo, el cerebro ha sido considerado como un órgano inmuno-privilegiado, debido a la falta de drenaje linfático, la poca permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y la aparente ausencia de respuestas inmunitarias. Sin embargo, este concepto se ha redefinido considerando que una respuesta inflamatoria robusta puede ser provocada en el cerebro en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, invasión de patógenos o lesiones, y que infecciones sistémicas activan células inmunes residentes en cerebro sin afectar la BHE<sup>124</sup>.

#### Células y mediadores inmunes en Sistema Nervioso

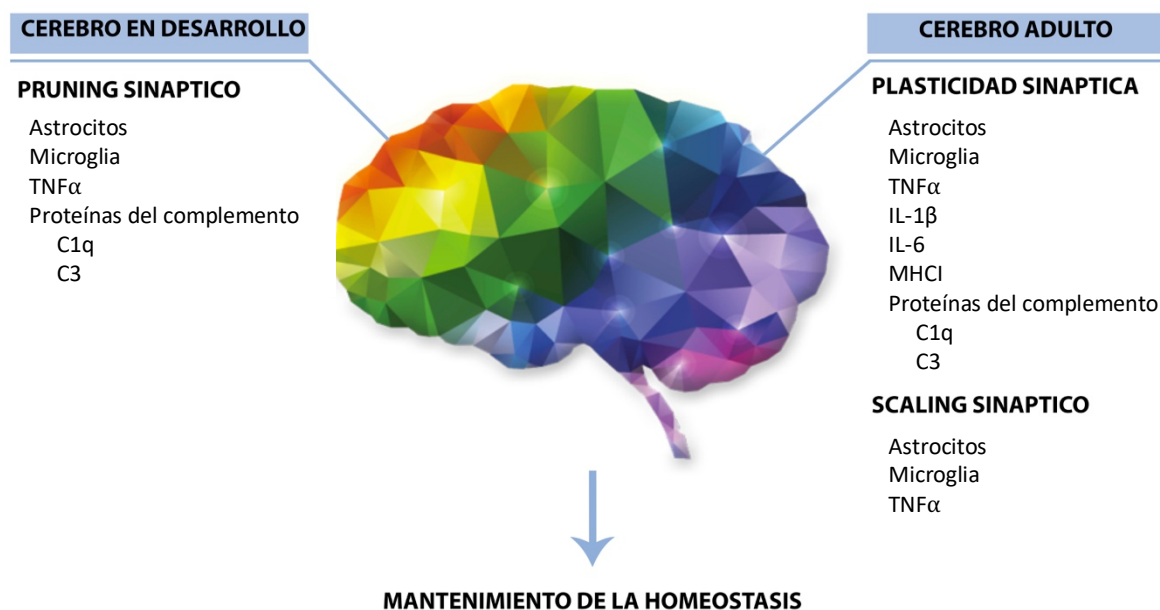
En el parénquima cerebral los macrófagos residentes son las células **microgliales**. Se trata de una población autorrenovable derivada de células precursoras mieloides del saco vitelino que invaden el SNC entre los días embrionarios 8.5-9.5<sup>125</sup>. Las células microgliales están constantemente censando el parénquima cerebral y son las células más plásticas desde el punto de vista morfológico. Se ha determinado que existen distintos niveles de activación microglial en respuesta a diversos estímulos, lo cual, morfológicamente se caracteriza por pasar de un estado de vigilancia (de patógenos e injurias) con somas pequeños y ramificaciones o procesos prolongados y delgados, a estadios activados donde el soma aumenta su tamaño, las ramificaciones se van acortando y engrosando. Finalmente, cuando cumple su función fagocítica, toma la típica forma ameboide<sup>126</sup>. En el cerebro en desarrollo y en áreas de remodelación, la microglia es responsable de la fagocitosis de desechos celulares resultante de la apoptosis y muerte celular normal<sup>127</sup>. Varios estímulos pueden causar la activación microglial, lo cual además de los cambios en la morfología, implica también la liberación de factores citotóxicos o neuroprotectores, como citoquinas y factores de

crecimiento, alteraciones en la expresión de marcadores de superficie (MHCII, CD45, CD11b, CD163, CD204) y fagocitosis de restos de tejidos y patógenos<sup>128</sup>.

Los **astrocitos** son la principal población de células gliales en el SNC y la segunda fuente principal de citoquinas cerebrales. Después de una injuria en cerebro, los astrocitos se activan y forman astrogliosis reactiva, lo cual es importante para aislar el área lesionada y proteger a regiones adyacentes, sin embargo, puede resultar perjudicial para la regeneración axonal<sup>129</sup>. Además, los astrocitos forman la *glia limitans*, que rodea la vasculatura del SNC y controla la entrada de células infiltrantes periféricas<sup>130</sup>. La BHE incluye a capilares y vénulas en el cerebro y medula espinal, compuesta por células endoteliales especializadas, la cual limita el transporte de factores específicos y solutos al parénquima, incluyendo más del 98% de anticuerpos y moléculas pequeñas, pero asegurando la salida de otros<sup>131</sup>. La integridad de la BHE puede afectarse ante injurias o condiciones patológicas, cuando las células endoteliales se activan junto con astrocitos de la *glia limitans*, y como consecuencia se forman canales transendoteliales, facilitando la migración de leucocitos al parénquima cerebral<sup>131</sup>.

Durante condiciones patológicas, las neuronas lesionadas liberan citoquinas y neurotransmisores que activan células involucradas en el proceso de la neuroinflamación. La microglia activada libera a su vez mediadores inflamatorios que conducen también al reclutamiento de macrófagos periféricos, células dendríticas y linfocitos T desde los vasos linfáticos meníngeos o vasos sanguíneos<sup>132,133</sup>. Astrocitos y neuronas adyacentes se activan en paralelo, lo cual conduce a una mayor liberación de factores inmunes<sup>125</sup>.

Está ampliamente aceptado que células gliales y sus mediadores, no sólo cumplen funciones estrictamente inmunológicas, sino también ayudan a mantener la homeostasis en el sistema nervioso en desarrollo y maduro, ya que participan en la modulación de la conectividad neural, afectando procesos como el crecimiento y guiado de neuritas, la formación de sinapsis, el refinamiento o *pruning* sináptico, *scaling* sináptico, que constituyen las bases biológicas del comportamiento, del aprendizaje y la memoria<sup>125</sup>. De hecho, se ha demostrado que varias proteínas inmunes cumplen funciones no inmunes en el cerebro: incluyendo citoquinas pro inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6), proteínas del sistema inmune innato (Complemento C1q y C3), proteínas del sistema inmune adaptativo (Miembros de la familia del complejo mayor de histocompatibilidad clase I [MHCI] e inmunorreceptores de unión a MHCI y sus componentes [PIRB, Ly49, DAP12, CD3z])<sup>134,135</sup> (**Figura 9**). No sólo células residentes de parénquima cumplen roles en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. También las células T en meninges, a través de la citoquina IL-4, cumplen un rol esencial en la memoria y el rendimiento cognitivo; además, IL-4 ayuda a antagonizar los efectos nocivos de citoquinas pro-inflamatorias generadas por astrocitos y neuronas, por ejemplo, aumentando la producción de BDNF por parte de astrocitos<sup>136</sup>.



**Figura 9. Interacciones neuroinmunes.** *En el SNC, las células gliales y sus mediadores inmunes participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis en el cerebro tanto en etapas tempranas del desarrollo y en el cerebro adulto. Aunque el SNC es considerado un órgano inmunoprivilegiado, las interacciones entre el sistema inmune y el sistema nervioso son esenciales para el normal funcionamiento neuronal y sus conexiones.*

En resumen, desde el punto de vista inmunológico, en el cerebro, astrocitos y microglia actúan como sensores del daño y responden a una gran variedad de estímulos mediante la activación de vías de transcripción de genes con el fin de producir mediadores inflamatorios, como las citoquinas. Las citoquinas median interacciones complejas con otras células neuronales y no neuronales. La activación glial está dirigida a eliminar patógenos, pero en última instancia, puede resultar en la amplificación del daño y lesión tisular consecuente.

# CAPITULO 3

MeCP2:

## Inmunidad y Estrés Oxidativo

### INFLUENCIA DE MeCP2 EN EL SISTEMA INMUNE

Dado que MeCP2 se expresa en todos los tejidos y cumple diversas funciones, la mayoría aun desconocidas, RTT en consecuencia es un desorden multisistémico ya que afecta tanto al sistema nervioso, al sistema microvascular y endotelial, huesos, corazón, pulmones, fibroblastos de la piel, glóbulos rojos y células del sistema inmunológico<sup>34,137</sup>. Los modelos murinos de pérdida y sobreexpresión de MeCP2 que evalúan el papel potencial de las células no neuronales han confirmado que poseen un rol relevante en la patología de RTT. Sin embargo, aún no queda claro cómo MeCP2 modifica respuestas inmunes en el contexto de desórdenes asociados a alteraciones de la expresión de esta proteína. A continuación, se describen antecedentes reportados hasta el momento en RTT relacionados a alteraciones inmunológicas.

### Antecedentes de alteraciones inmunes en RTT

Con respecto a la relación entre MeCP2 y una disfunción inmune, se ha reportado un vínculo entre ciertos polimorfismos del gen MECP2 y enfermedades autoinmunes, tales como el síndrome de Sjögren primario<sup>138</sup>, lupus eritematoso sistémico<sup>139</sup>, artritis reumatoide<sup>140</sup> y esclerosis sistémica<sup>141</sup>.

En los pacientes con RTT se ha visto un incremento de citoquinas tipo Th2, como IL-9 e IL-13, que podrían ser indicativas de una respuesta Th2 prevalente, con la aparición de inmunidad mediada por anticuerpos y eosinófilos/mastocitos<sup>142</sup>. Por otro lado, una posible prevalencia de la respuesta Th2 podría estar en línea con indicios de activación de la inmunidad humoral en RTT, como el aumento de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de cerebro, NGF y altos niveles de autoanticuerpos séricos anti-N-glucosilación (N-Glc)<sup>143</sup>. También se ha identificado en un alto número de casos autoanticuerpos contra el receptor de folato en líquido cefalorraquídeo<sup>144</sup>. Sin embargo, otros autores no han podido detectar anticuerpos antineuronales o antigangliósidos, antinuclear o antimúsculo estriado o liso<sup>145</sup>.

Se ha descrito en pacientes con RTT un estado inflamatorio subclínico persistente. En este aspecto, mediante hematología de rutina, química clínica y análisis de proteómica 2-DE MALDI-TOF se determinó un total de 17 proteínas APR (proteínas inflamatorias de fase aguda) en suero de pacientes como SAA1 (proteína sérica amiloide A-1), A1AT (alfa-1 antitripsina) y CFAB (factor B de Complemento)<sup>143,146,147</sup>. Tales cambios fueron proporcionales a la gravedad de la mutación de cada paciente. También se reportaron alteraciones en niveles de citoquinas en RTT, como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-10, IL-17A, TGF $\beta$ , IL-8 y RANTES<sup>142,148,149</sup>. Recientemente se evidenció que pacientes con RTT muestran niveles diferenciales de citoquinas en saliva, ya que se hallaron niveles elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , y VEGF en RTT en comparación con los controles<sup>150</sup>. A su vez, las mismas citoquinas mostraron correlaciones positivas significativas con los puntajes de severidad clínica. Por otro lado, no se hallaron diferencias en las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p70, y IFN- $\gamma$ <sup>150</sup>.

Se ha puesto en evidencia que MeCP2 también es importante para la fisiología de células T. En pacientes con RTT se observa un porcentaje reducido de células CD8+ resultando en un balance CD4+/CD8+ aumentado. Sumado a pacientes con RTT, niños con duplicación de MeCP2, también muestran anomalías inmunológicas variables que incluyen reducciones en la memoria de las células T y B y en las NK<sup>151</sup>. También se ha reportado un aumento del receptor soluble de la citoquina IL-2 en suero de pacientes jóvenes<sup>145</sup>. Por otro lado, se determinó que en linfocitos clonados de pacientes con RTT, MeCP2 es necesaria para el crecimiento linfocitario, ya que mutaciones en esta proteína causa desventajas en células T



al reducir la respuesta a la estimulación mitogénica<sup>152</sup>. Aunque en este trabajo se hallaron niveles de células T expresando IFN $\gamma$ , otros autores han reportado niveles alterados de esta citoquina en pacientes con síndrome de duplicación de MeCP2<sup>153</sup>.

### **MECP2 Y ESTRÉS OXIDATIVO**

---

El balance redox es un equilibrio controlado de distintos compuestos endógenos celulares, en particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), NAD(P)H/NAD(P) y cisteína/cistina. Se mantiene mediante enzimas de equilibrio redox que desintoxican de oxidantes. Entre estas enzimas se incluyen la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD). La producción excesiva de ROS o su detoxificación insuficiente por enzimas antioxidantes, rompe el delicado balance de las ROS, llevando a aumentos elevados y por consiguiente a estrés oxidativo<sup>154</sup>. El estrés oxidativo (EO) denota altos niveles de ROS y resulta en daño en ADN, lípidos y proteínas. El radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) se convierte principalmente en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o interactúa con el óxido nítrico (ON), formando especies reactivas del nitrógeno (RNS) que podrán peroxidar lípidos o nitrosilar proteínas<sup>155</sup>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es menos reactivo y actúa como mensajero intracelular. La baja producción de ROS/RNS es fundamental para mantener procesos fisiológicos ya que actúan como moléculas de señalización e interfieren en distintas vías incluyendo aquellas que regulan la función inmune<sup>156</sup>. La primera evidencia que relacionó el EO con RTT llegó a finales de los años 80's cuando se encontró una severa reducción de vitamina C y Glutatión en muestras de cerebros post-mortem de pacientes<sup>157</sup>.

En pacientes con RTT, la generación anormal de ROS mitocondrial, la pérdida del equilibrio redox y el daño oxidativo potencial se manifiestan a una edad temprana y, como consecuencia, pueden facilitar la progresión de la enfermedad al intensificar la oxidación de lípidos y proteínas<sup>158,159</sup>. En este sentido, en muestras de sangre de pacientes RTT se han detectado niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo, como Hierro no unido a proteínas intra-eritrocitarias (NPBI; es decir, hierro libre), NPBI plasmática, productos de la lipoperoxidación (como F<sub>2</sub>-isoprostanos, neuroisoprostanos, 4-HNE, y MDA) y proteínas carboniladas (producto de la oxidación de proteínas)<sup>160</sup>. Este mecanismo de avance puede prevenirse con antioxidantes o eliminadores de radicales libres<sup>161</sup> ya que además, el daño oxidativo se ha asociado con hipoxia intermitente por el déficit en el intercambio gaseoso que ocurre en estos pacientes<sup>160</sup>. La disminución de anti-oxidantes se ha evidenciado en suero/plasma, en eritrocitos y fibroblastos de la piel<sup>160,162</sup>. Para enfrentar el desbalance redox, un mecanismo compensatorio en RTT involucraría un aumento en la expresión de genes como SOD1, CAT y Gpx; sin embargo, la actividad de estas enzimas se vio reducida en cultivo primario de fibroblastos de pacientes<sup>163</sup>. A su vez, se ha demostrado una persistente

disfunción mitocondrial asociada con cambios ultraestructurales en mitocondrias, desregulación génica, degradación de proteínas y plegamiento de cromatina y el deterioro en la captación de ROS<sup>148</sup>. A través de análisis ultraestructural de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes de RTT, se han evidenciado marcadas alteraciones subcelulares. Entre esas alteraciones se observaron núcleos retraídos con forma irregular y una relación núcleo/citoplasma marcadamente disminuida y mayor cantidad de citoplasma con numerosas mitocondrias. En particular, estas células muestran mitocondrias con morfología anormal, con ruptura y pérdida de crestas<sup>161</sup>. En conjunto, estos hallazgos sugieren que alteraciones mitocondriales y el estado crónico de estrés oxidativo constituyen en la actualidad un componente preponderante en la patogénesis de RTT.

### **ESTUDIO DE RESPUESTAS NEUROINFLAMATORIAS: ESTRATEGIA PARA EVALUAR EL ROL DE MeCP2 EN RESPUESTAS INMUNES**

Numerosos estudios en el área de la inmunología hacen uso de distintos modelos de enfermedades humanas<sup>164</sup> así como estímulos sistémicos<sup>165</sup> para comprender cómo determinadas proteínas y células orquestan respuestas inmunes y neuroinflamatorias. La gran recopilación de datos, así como la caracterización de cambios bioquímicos y patológicos en tales modelos, facilita su uso para identificar posibles alteraciones en respuestas inmunes mediadas por factores como receptores de citoquinas, expresión de citoquinas y/o quemoquinas, mutaciones genéticas, etc. Entre los modelos y métodos más utilizados se encuentran la colitis autoinmune, inyecciones de LPS que imitan a una infección y la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)<sup>153,164,165</sup>. Este último modela a la enfermedad humana esclerosis múltiple y en esta tesis se aplicará como un estímulo inmune que promueve la neuroinflamación, con el fin de dilucidar el rol de MeCP2 en este contexto.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante crónica, progresiva y neuroinflamatoria que afecta al cerebro y a la médula espinal<sup>166</sup>. Se caracteriza por la presencia en pacientes de infiltrados inflamatorios, placas desmielinizantes y daño axonal<sup>167</sup>. De acuerdo con la hipótesis autoinmune del desarrollo de la EM, factores genéticos (MHC) y ambientales como una infección viral, o la presencia de ciertos antígenos o superantígenos que presentan similitudes moleculares (mimetismo) con antígenos de SNC promueven la activación de células T CD4<sup>+</sup><sup>168,169</sup>.

### Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE)

La EAE es un modelo que reproduce muchas de las características clínicas, bioquímicas, inmunológicas y patológicas de la EM. Este modelo fue inicialmente desarrollado en la década de 1930s<sup>170</sup> y descrita como una enfermedad mediada por células T en los 80s. Este modelo se puede aplicar en distintas especies animales como ratas, ratones, conejos, cobayos y monos<sup>166</sup>. De acuerdo con el protocolo de inmunización empleado, la especie o cepa del animal seleccionado para el estudio y el modelo de inducción (activa o pasiva), el desarrollo de la EAE puede tener diferentes cursos clínicos: patología aguda, crónica o progresiva con recaídas y remisiones<sup>171</sup>.

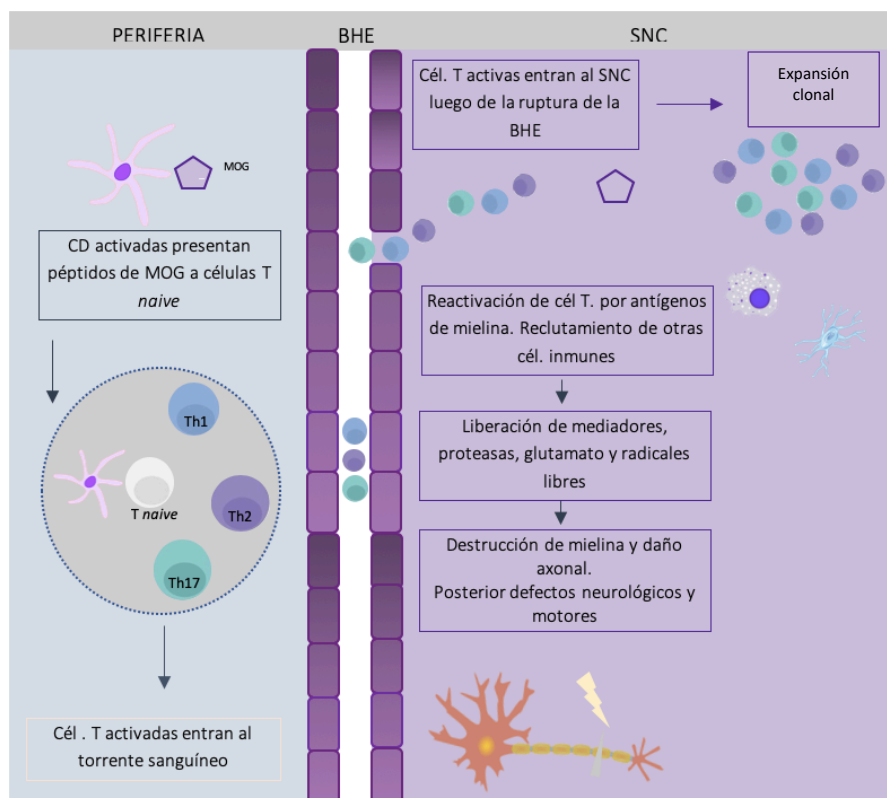
En el modelo más frecuentemente utilizado, la EAE es inducida en ratones mediante inmunización con una emulsión agua-aceite en el cual el antígeno de mielina, en el cual el adyuvante de Freund completo (CFA) se mezcla con un antígeno de mielina; los antígenos más utilizados son la glicoproteína de mielina de oligodendrocito (MOG), la proteína básica de mielina (MBP) o la proteína protelípida (PLP). El adyuvante completo de Freund contiene altos niveles de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor, con el fin de activar el sistema inmune innato a través de los TLR<sup>172</sup>. Esta emulsión es inyectada subcutáneamente en el lomo o flanco interno posterior del animal. Además, se deben aplicar inyecciones de la toxina *Pertussis* que participa modulando la permeabilidad de la BHE lo cual permitirá el ingreso de células inmunes al parénquima del SNC<sup>166,173</sup>. En general, los signos clínicos presentados por los animales durante el curso de la patología son la pérdida de peso, parálisis ascendente que puede iniciarse con flacidez en la cola, parálisis de las extremidades posteriores, y pocas veces puede llevar a un estado de muerte<sup>174</sup>. Si bien las lesiones presentadas en EAE y en la EM se caracterizan por inflamación y frecuente desmielinización, existen algunas diferencias entre la patología humana y los modelos experimentales; por ejemplo, en modelos animales, las lesiones se presentan predominantemente en la médula espinal, mientras que en la EM son más comunes en cerebro<sup>175,176</sup>.

### Mecanismo patogénico de la EAE

En la EAE, la patología se desarrolla cuando las CPA, principalmente CD4, captan y procesan los péptidos de mielina inyectados y migran a los órganos linfáticos secundarios (como los ganglios linfáticos y bazo)<sup>176</sup>. Las CPA son activadas por los componentes presentes en *Mycobacterium tuberculosis* a través de los TLR y presentan péptidos derivados de antígenos de mielina a las células T *naive* o vírgenes<sup>177,178</sup>. Los linfocitos T se activan y diferencian, principalmente en células Th1 y Th17 las cuales van a proliferar y serán capaces de producir citoquinas pro-inflamatorias, como IFN $\gamma$  e IL-17, respectivamente<sup>179</sup>. Las células

T efectoras entran al SNC a través de vénulas postcapilares y se acumulan en el espacio perivascular presente en la BHE. La penetración de la membrana parenquimal de la BHE es facilitada por las metaloproteasas de matriz (MMP2 y MMP9) secretadas por células T, macrófagos, y neutrófilos<sup>180</sup>. Al mismo tiempo, los linfocitos van a aumentar la expresión de moléculas de adhesión que interaccionan con otras presentes en el endotelio<sup>178</sup>.

Una vez en el SNC, las células T son reactivadas por macrófagos, CDs y células B ya que actúan como presentadoras de autoantígenos de mielina y secretan citoquinas como IL-17, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , entre otras<sup>176</sup>. La citoquina IL-17, quemoquinas y MMPs atraen a monocitos y neutrófilos para ser reclutados<sup>176</sup>. Sólo aquellos linfocitos que posean en su superficie un receptor TCR capaces de generar una reacción cruzada con los péptidos derivados de antígenos de mielina presentados por las CPA locales (microglia y astrocitos) e infiltrantes (macrófagos y células dendríticas), van a ser retenidas en el parénquima<sup>180</sup>. Una vez en SNC, estos leucocitos infiltrantes (neutrófilos, monocitos/macrófagos, CDs, linfocitos T CD8+, linfocitos B, etc.) y células residentes, como microglia activada, liberan mediadores inflamatorios, como enzimas proteolíticas, citoquinas y radicales libres<sup>181</sup>. De esta manera se produce el daño directo a la mielina de axones, generando posteriormente el deterioro neurológico.



**Figura 10. Mecanismo de patogenicidad en la EAE.** Los linfocitos T se activan en órganos linfáticos periféricos, allí se diferencian y proliferan. Posteriormente pasan a la circulación y migran a través de la BHE hacia el SNC, donde las células son reactivadas por componentes de mielina y se produce la expansión clonal. Finalmente se induce la inflamación y el daño neuronal. CD: célula dendrítica. BHE: barrera hematoencefálica. Cél. T: células T. Cél. Inmune: células inmunes<sup>181</sup>.

# HIPÓTESIS

En los últimos años se ha podido establecer que MeCP2 se expresa en células inmunes y no sólo en neuronas y, en consecuencia, se plantea una nueva visión de la patogénesis en RTT en la cual el sistema inmunológico cumpliría un rol activo en el mantenimiento de la patogénesis en humanos. Sin embargo, dada la gran complejidad de la presentación clínica en RTT, aún no queda claro cómo participaría el sistema inmune en la patogénesis y el mantenimiento de alteraciones en RTT.

Se evidenció que en células T CD4+ *naive*, MeCP2 es indispensable para la diferenciación a células Th1 y Th17<sup>153</sup>. También se reportó que la sobreexpresión de MeCP2 en células T CD4+ fallan en comprometerse y diferenciarse en células Th1, demostrado por niveles bajos de producción de IFN $\gamma$  que conducen a un fenotipo inmunosupresor. Asimismo, la sobreexpresión de MeCP2 en ratón también suprime de forma aberrante la secreción de IFN $\gamma$  de células Th1<sup>151</sup>. Además se reportó la expresión de MeCP2 en células T regulatorias y se ha demostrado que MeCP2 es requerida para mantener la expresión de FoxP3 en condiciones de activación inmune<sup>164</sup>.

Se ha propuesto que disfunciones en células mieloides como macrófagos y microglia, contribuirían activamente a la patogénesis de RTT. En pacientes con RTT se identificaron niveles anormales de citoquinas relacionadas a macrófagos, como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>149</sup>. Además, se determinó que en ratones *MeCP2-null*, estas poblaciones celulares muestran una disminución en su tamaño a lo largo del curso patológico y alteraciones en respuestas a estrés y activación inmune<sup>165</sup>. Por otro lado, se observó que el trasplante de médula ósea de animales WT en ratones *MeCP2-null* irradiados, y posterior repoblación de macrófagos/microglia WT, aumentó la longevidad y recuperó varios fenotipos patológicos<sup>42</sup>. Sin embargo, tales resultados no han podido ser reproducidos<sup>182</sup>. En general, estudios en poblaciones mieloides se han concentrado principalmente en células microgliales debido a su estrecha interacción con neuronas. Si bien las células microgliales y los macrófagos residentes de tejidos comparten un origen embrionario en común<sup>183</sup>, se evidenció que MeCP2 actúa de manera célula-dependiente<sup>165</sup>.

Teniendo en cuenta tales antecedentes, cabe aclarar que la mayoría de los estudios realizados para determinar el rol de MeCP2 en la interacción neuroinmune y su participación en la homeostasis inmunológica, se han realizado en condiciones de ausencia total de esta proteína. Por lo tanto, desde un punto de vista potencialmente traslacional, la interpretación de tales resultados resulta compleja a la hora de esclarecer su función en el contexto de RTT

y desórdenes asociados, en donde se encuentra expresada MeCP2 en forma parcialmente funcional. Por lo tanto, no existe un claro consenso sobre cuales vías o genes estaría regulando o modulando MeCP2 en condiciones de activación inmune *in-vivo*.

Nuestra hipótesis de trabajo es que MeCP2 es crítica para el correcto funcionamiento tanto del sistema nervioso como del sistema inmunológico y, por lo tanto, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis neuroinmune. Ambos son fundamentales para la supervivencia de un organismo, y son altamente sensibles al estímulo contextual y al estrés que el organismo afronta. Proponemos que MeCP2 es primordial para esta coordinación delicada de respuestas altamente dinámicas a estímulos inmunes por lo que consideramos que es clave evaluar su rol en condiciones de activación crónica y aguda *in-vivo* e *in-vitro* respectivamente.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

---

**Evaluar el rol de MeCP2 en respuestas neuroinflamatorias en un modelo animal del Síndrome de Rett, cuyo fenotipo clínico-patológico es altamente reproducible y bien definido.**

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

---

**01**

**Caracterizar fenotípica y funcionalmente poblaciones de macrófagos provenientes de ratones mutantes para MeCP2.**

**A.** Determinar la capacidad de diferenciación de precursores de médula ósea a macrófagos.

**B.** Caracterizar la respuesta de macrófagos diferenciados de médula ósea de animales en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio y anti-inflamatorio:

- Analizar el nivel de expresión de citoquinas y marcadores fenotípicos.
- Estudiar los niveles de óxido nítrico y superóxido producidos.

**02**

**Evaluar el desarrollo de respuestas neuroinflamatorias en ratones mutantes para MeCP2 frente a un desafío autoinmune (Encefalomiелitis Autoinmune Experimental).**

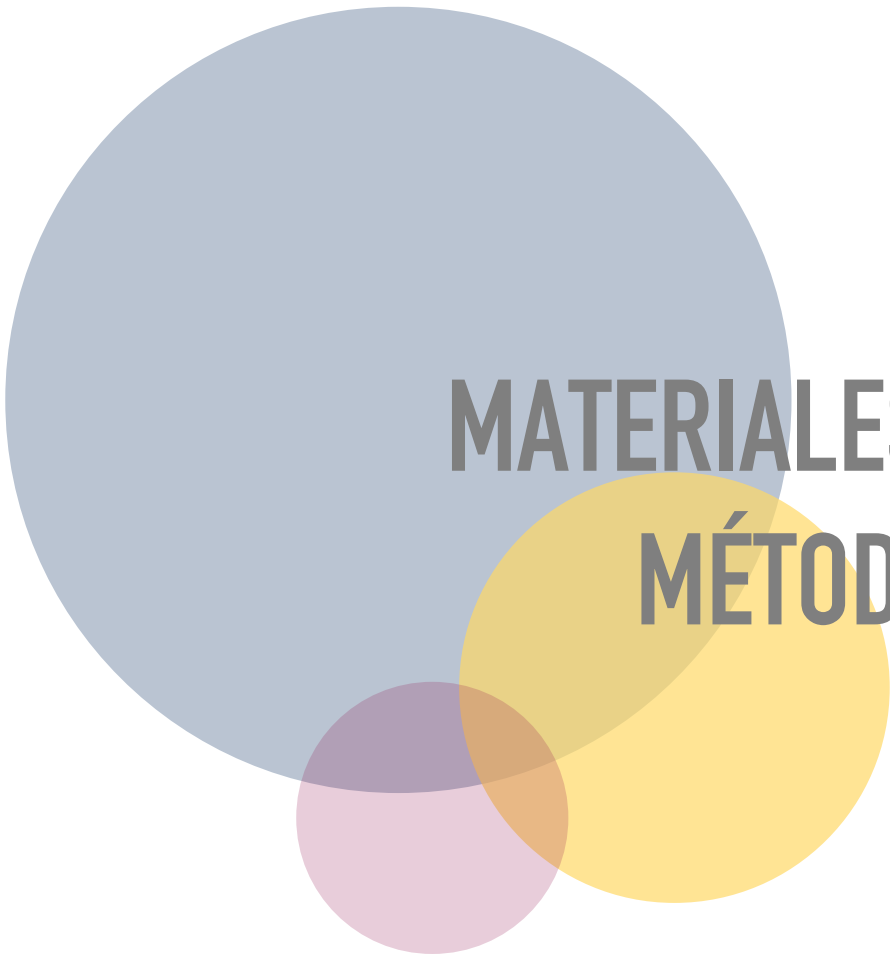
**A.** Evaluar el nivel de neuroinflamación. Para ello, en médula espinal lumbar se va a:

- Examinar la presencia de células inmunes infiltrantes en médula.
- Establecer el nivel de microgliosis en médula.
- Determinar niveles de expresión de citoquinas y mediadores inmunes.

**B.** Caracterizar el perfil inmunológico de células mononucleares aisladas de bazo de animales para:

- Establecer el nivel de proliferación antígeno-específica.
- Analizar el nivel de autorreactividad antígeno-específica al evaluar la producción de citoquinas pro y anti-inflamatoria





**MATERIALES Y  
MÉTODOS**

## MODELOS *IN-VIVO* E *IN-VITRO*

### **Modelo animal: ratones MeCP2<sup>308/y</sup>**

Para la realización de esta tesis se utilizaron *ratones mutantes MeCP2<sup>308/y</sup>*. Este modelo presenta un codón de terminación temprano que genera una proteína truncada en el aminoácido 308, provocando la pérdida de la región C-terminal de la proteína. Esta forma truncada de MeCP2, pierde varios posibles sitios de fosforilación alojados en esa región (**Figura 3**) que son claves para su unión a co-represores. Asimismo, la ausencia del dominio C-terminal conlleva a una menor estabilidad y menor vida media de la proteína truncada que la forma WT. Como consecuencia este modelo representa una condición de “deficiencia de la función de MeCP2”, en contraposición al modelo *MeCP2-null* que carece totalmente de la misma<sup>67</sup>. De aquí en adelante para facilitar la redacción de esta tesis, se lo llamará **ratón MeCP2-MUT o MUT** para diferenciarlos de los salvajes o *wild type*, **WT**. El modelo mutante muestra un fenotipo neurológico progresivo, similar a lo que se presenta en humanos. En estos ratones se puede diferenciar una etapa pre-sintomática (hasta la sexta semana de vida post-natal) y post-sintomática. Dado que este modelo tienen una sobrevivencia mucho mayor al modelo *null* (9-11 semanas), fue posible realizar los estudios inmunológicos aquí propuestos, en especial la inducción del modelo de EAE.

Estos animales se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los ratones se mantuvieron alojados en el Bioterio del Departamento de Química Biológica – CIQUIBIC de la Facultad de Ciencias Químicas, en una sala con aire filtrado y condiciones controladas de luz/oscuridad (12 hs/12hs) y temperatura entre 22-24°C, con provisión de agua y alimento estéril *ad libitum* (alimento balanceado “Cooperación” irradiado). La colonia se mantuvo en un *background* C57BL/6J, para lo cual hembras heterocigotas portadoras de la mutación en MeCP2 fueron apareadas con machos WT de la cepa C57BL/6J (obtenidos del Instituto de Investigaciones Médicas M. Ferreyra- INIMEC, Córdoba, Argentina). Las crías se genotipificaron y en todos los experimentos desarrollados en esta tesis se trabajó con animales WT y mutantes (MUT) de la misma camada. Para todos los experimentos se utilizaron ratones macho para evitar las variaciones fenotípicas generadas en el proceso de inactivación aleatoria del cromosoma X. Dado que el gen que codifica a MeCP2 se encuentra en el cromosoma X, las hembras presentan un espectro de manifestaciones y de porcentajes de expresión de los alelos *wild type* y mutante en distintos tejidos, lo cual dificulta la interpretación de resultados. Sólo se utilizaron hembras heterocigotas para la obtención de sueros y posterior análisis de autoanticuerpos a través de la técnica de Western Blotting (ver Anexo).

**Tabla 1.** Fenotipos característicos del modelo MUT (MeCP2<sup>308/y</sup>). Resumen de las características típicas del modelo utilizado en esta tesis y de importancia clínica en RTT<sup>3</sup>.

CARACTERÍSTICAS	MODELO MUT
MeCP2	Truncada en el aa 308
Fenotipo neurológico	Progresivo
Potenciación a largo plazo (LTP)	Reducido
Hipoactividad	✓ .
Estereotipias	Frotamiento de patas delanteras
Cifosis	✓ .
Espasticidad	Extremidades posteriores juntas
Temblores	✓ .
Convulsiones	✓ .
Disfunciones motoras	✓ .
Ansiedad	Aumentada
Déficits de aprendizaje y memoria	✓ .
Anormalidades de comportamiento social	✓ .
Edad de muerte	15 meses

#### **Modelo *in-vitro*: obtención de macrófagos diferenciados de médula ósea (MDMO)**

Ratones WT y MUT para MeCP2 de entre 6-8 semanas de edad se sacrificaron por dislocación cervical y rápidamente se prosiguió a obtener los huesos de ambas piernas traseras con el fin de aislar la médula ósea del fémur y tibia. En placas de 10cm se sembraron  $2 \times 10^5$  células en 10 mL de medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino libre de endotoxinas, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Gentamicina, 2mM de L-Glutamina y 20ng/mL del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A los 3 días de incubación se adicionaron 10 ml de medio conteniendo M-CSF. Al día 6 de diferenciación *in-vitro*, las células se cosecharon y marcaron con el anticuerpo específico para

macrófagos (anti-CD11b en una dilución 1/400) y se realizó una citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CD11b+. El número y viabilidad de células se estimaron por recuento en solución 0.2% de Azul de Trypan en cámara de Neubauer.

### REACTIVOS

Suero fetal bovino (SFB) de Natocor (Córdoba, Argentina), Gentamicina de Schering-Plough (México D.F., México). Adyuvante de Freund completo (CFA), medio RPMI 1640, L-Glutamina, tripsina, Azul de tripán, dimetilsulfóxido (DMSO), lipopolisacárido (LPS, Escherichia coli, cepa 0111:B4), IFN $\gamma$ , M-CSF e IL-4 recombinantes fueron obtenidos de Biolegend (San Diego, CA, USA). Sulfanilamida, N-(1-naftil)-etilendiamina, nitrito de sodio, 2-Mercaptoetanol, acrilamida y bis-acrilamida de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA). Ketamina (Ketonal, 50 mg/mL) anestésico general disociativo, Xilacina (Xiliacina 20 Richmond, 20 mg/mL) analgésico sedante. Solución fisiológica esterilizada (Laborit). TRIzol Reagent, DNAsa I y SYBR green PCR master mix se adquirieron en Invitrogen (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Inhibidor de RNAsas recombinante (RNasin) y enzima transcriptasa reversa M-MLV se compraron en Promega (Madison, WI, USA). Cuando fue necesario, la concentración de proteínas de las muestras fue determinada mediante el método de Bradford utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### Buffers

Buffer fosfato salino (PBS) 1X

Buffer FACS: 1 mL de EDTA 0,5 M, 1 mL de solución 10 % de azida de sodio, 1mL de solución de BSA 1%, llevar a volumen final de 100 mL con PBS.

## METODOLOGÍA

### GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

A los 10-15 DPN (días post-natal) todas las crías de las cruzas realizadas entre madres heterocigotas para la mutación en MeCP2 con machos WT de la cepa C57BL/6J, fueron genotipicados para la posterior utilización de los machos para proseguir con los experimentos; y las hembras se mantuvieron como stock para futuras cruzas y mantenimiento de la colonia.

#### **Aislamiento del ADN genómico**

Se obtuvieron 2 mm de la cola del animal y se colocó en un eppendorf identificado para cada animal. Para la degradación del tejido, se le agregó a cada tubo 500  $\mu$ L de 50 mM NaOH 0,05M y se lo incubó a 95°C a baño maría por 1 h. Luego se colocaron en hielo por 5 min, posteriormente se neutralizaron con 50  $\mu$ L TrisHCl 1M pH 8.0 y se centrifugaron 5 minutos a 12,000 rpm con el fin de precipitar y descartar los restos del homogenato. El sobrenadante conteniendo el ADN se pasó a un nuevo tubo. El ADN genómico en suspensión fue almacenado a -20°C hasta ser analizado.

#### **Reacción en cadena de la ADN polimerasa**

A cada tubo de PCR se le agregaron 2  $\mu$ L de la muestra de ADN genómico correctamente resuspendido, 0,6  $\mu$ L de cada solución madre de 20 $\mu$ M de primer y 3.5  $\mu$ L de mezcla de PCR constituida por los siguientes reactivos 1.2  $\mu$ L Mg Free Buffer 10X Promega, 1.2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 25Mm., 0.6  $\mu$ L Primer 1 (MeCP2 T1F, 20 $\mu$ M), 0.6  $\mu$ L Primer 2 (MeCP2 T1BR, 20 $\mu$ M), 0.6  $\mu$ L Primer 3 (MeCP2 T1AR, 20 $\mu$ M), 1  $\mu$ L dNTP 2.5mM, 0.1 MI Taq Polimerasa Promega (5U/ $\mu$ l). Todas las muestras se llevaron a volumen final de 12  $\mu$ L con agua milliQ estéril. Ver **Tabla 2** las secuencias de los primers utilizados.

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), utilizando el siguiente esquema estándar de ciclos de temperatura:

1. Desnaturalización inicial del DNA a 94°C por 3 minutos.
2. Desnaturalización del DNA a 94°C por 30 segundos.
3. Unión de los primers al ADN molde a 62°C por 30 segundos.
4. Polimerización y extensión de los fragmentos a amplificar por la polimerasa a 72°C por 1 minuto.
5. Repetición de la curva de temperatura desde el paso 2 al 4 durante 35 ciclos.
6. Finalmente, al programa se da término con una extensión de la polimerasa de 2 minutos a 72°C, para asegurar la completa polimerización de los productos amplificados.

**Tabla 2.** Secuencia de cebadores o primers para las PCR destinadas a la genotipificación de ratones.

SECUENCIAS DE LOS CEBADORES O PRIMERS PARA PCR DE MeCP2-308		
ARN mensajero	Secuencia 5' ->3'	Tamaño del amplicón (pb)
<b>MeCP2 T1F</b>	AACGGGGTAGAAAGCCTG	WT= 396
<b>MeCP2 T1BR</b>	ATGCTCCAGACTGCCTTG	MUT= 318
<b>MeCP2 T1AR</b>	TGATGGGGTCCTCAGAGC	HET= 396 y 318

### Electroforesis de ADN en geles de agarosa

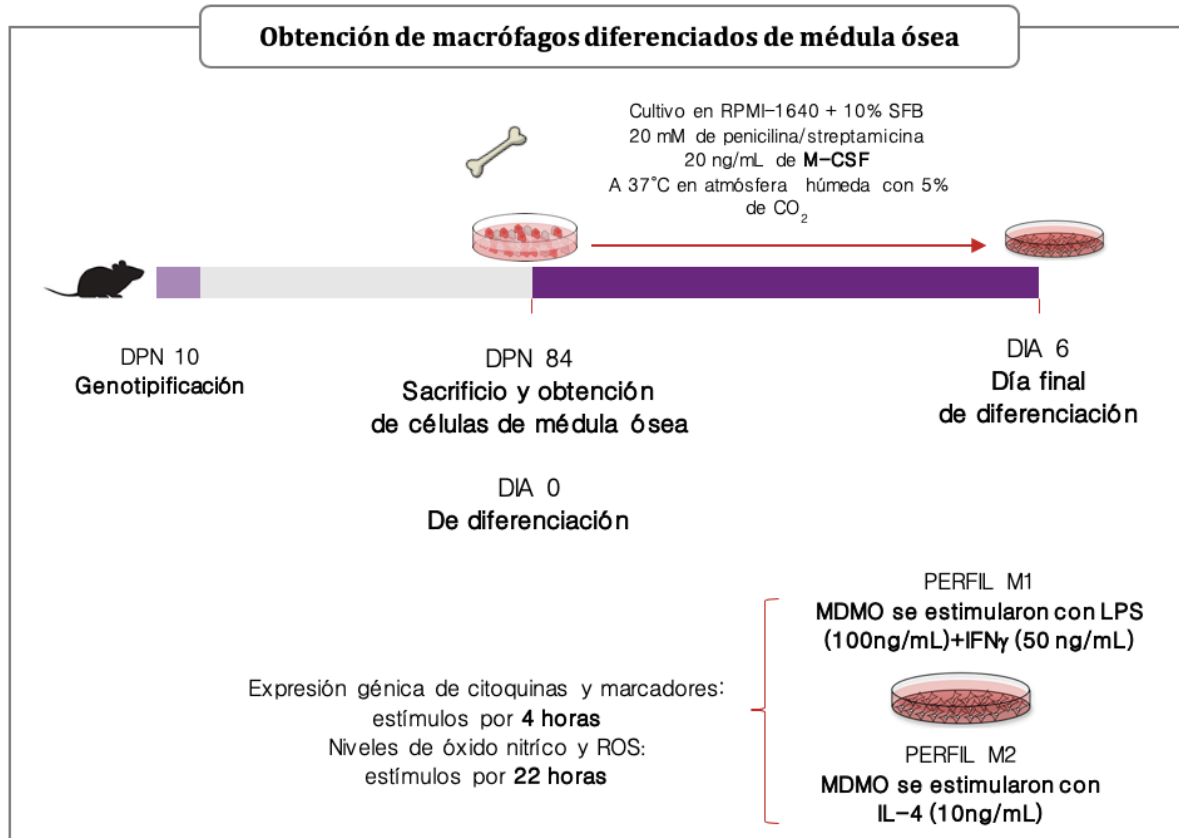
Los productos de la PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para la preparación del gel se pesó 1 gr de agarosa y se lo disolvió en 50 mL de la solución tampón TAE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0 1M EDTA pH=8) calentándolo en microondas evitando la ebullición de la mezcla. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le agregó 2,5µL de bromuro de etidio a partir de una solución stock de 10 mg/ml. Posteriormente se vació la mezcla en un molde acrílico de la cámara electroforética (Bio Rad, California, USA) y se colocó el respectivo peine dependiendo de la cantidad de muestras a sembrar, para formar los pocillos en el gel a polimerizar.

Posteriormente se procedió a la migración electroforética sometiendo el gel conteniendo las muestras con 2 µl de loading buffer a una corriente a voltaje constante (100mV) para la separación por tamaño molecular de los fragmentos de ADN. El tamaño de los fragmentos separados se estimó comparando las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular (100 pb ADN ladder), los cuales se cargaron en el gel junto a las muestras y controles. Para identificar los fragmentos de ADN luego de la corrida electroforética, se visualizó bajo luz UV resultado de la incorporación del bromuro de etidio a la doble hebra del ADN. Todos los resultados obtenidos se registraron utilizando el transiluminador UV (Ultraviolet Transilluminator BioImaging System) acoplado a un sistema de documentación fotográfica (Gel Doc-it, Imaging System).

Para los ratones MeCP2-308, los resultados posibles de la genotipificación pueden ser los siguientes patrones de banda:

- Una banda de 396 pares de base (pb) para ratones WT
- Una banda de 318 pb para ratones MUT
- Dos bandas (una de 318 pb y otra de 396 pb) para ratones hembra heterocigotas.

## DISEÑO EXPERIMENTAL PARTE I: ESTUDIOS EN MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MÉDULA ÓSEA DE ANIMALES MUT



**Figura 11. Diseño experimental para la obtención de MDMO.** Posterior a la genotipificación de los ratones, animales WT y MUT 12 semanas de edad fueron antestesiados y se aislaron las extremidades posteriores. Se obtuvieron los precursores de médula ósea y se incubaron por 6 días en presencia de M-CSF. Posteriormente se cosecharon, contaron, y se estimularon con LPS+IFN $\gamma$  (M1) o IL-4 (M2) durante periodos de tiempo (4 o 22 horas) de acuerdo al experimento a realizar.

## MÉTODOS PARTE I: ESTUDIOS EN MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MÉDULA ÓSEA Y EN ANIMALES MUT

### CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CD11b+ POR CITOMETRIA DE FLUJO

Para la marcación de las poblaciones de macrófagos al día 6 de diferenciación de los precursores con el factor M-CSF, se procedió a cosechar las células y llevar a 1 millón de células a un volumen final de 500  $\mu$ l con FACS. Posteriormente se incubaron en hielo por 30 min con el anticuerpo anti-CD11b conjugado a APC (hecho en rata. Fabricado por Biolegend. *Cat. 101211*). Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS. Se adquirieron al menos 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y se analizaron con el software FlowJo versión 5.7.2.

### ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (ON)

Se cuantificaron los nitritos presentes en los sobrenadantes de 22 h de cultivos de macrófagos diferenciados de médula ósea para determinar de manera indirecta el nivel de ON, mediante la reacción de Griess<sup>184</sup>. Para ello, primero  $1 \times 10^6$  MDMO fueron cultivadas en una placa de 48 pocillos por 22 horas en presencia de LPS+IFN $\gamma$  ó IL-4 a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se colocaron 100  $\mu$ L de sobrenadante en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano y 100  $\mu$ L de una mezcla de sulfanilamida 10 mg/ml y N-(1-naftil)-etilendiamina 1mg/mL disuelta en 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se midió la densidad óptica en la longitud de onda de 550 nm. Los valores obtenidos se expresaron como concentración de nitritos ( $\mu$ M) y se extrapoló utilizando una curva estándar de nitrito de sodio.

### PRODUCCIÓN DEL RADICAL SUPEROXIDO (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por macrófagos derivados de médula ósea se evaluó mediante la exposición de las células a Cloruro de Nitroblue Tetrazolium (NBT), la solubilización del formazán azul y cuantificación de su absorbancia. Se cultivaron macrófagos con diferentes estímulos en microplacas de 96 pocillos por 22 h. Posteriormente, se descartaron los sobrenadantes por inversión y se incubaron las células con una solución de NBT 1mg/mL diluido en PBS y filtrado. Seguido de 30 min de incubación en estufa a 37°C, las células se fijaron con 100  $\mu$ L de etanol 70% por 5 min. Por último, se disolvió el precipitado azul con



100  $\mu\text{L}$  de KOH 2M y 100  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido y se determinó la DO a 655 nm. A mayor densidad óptica medida, mayor producción de  $\text{O}_2^-$  <sup>185</sup>.

### **RT-PCR EN TIEMPO REAL**

#### **Purificación de ARN y síntesis de cDNA.**

Un millón de MDMO se cultivaron en una placa de 24 pocillos con RPMI completo. Se dejaron adherir al fondo de la placa toda la noche y al día siguiente se agregó nuevo medio conteniendo LPS+IFN $\gamma$  o IL-4 por 4 h. Para realizar la extracción de ARN de MDMO, se desecharon los sobrenadantes de cada pocillo, y se agregó 1 mL de Trizol (para una placa de 35 mm) para lisar las células que quedaron en el fondo de la placa, pipeteando repetidas veces. Luego se pasaron a tubos libres de RNasa y se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, se mantuvieron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se centrifugaron a 13,000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 15 min. A la fase acuosa se le agregó 1 mL de Isopropanol y se incubó toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$  con el fin de permitir la precipitación del ARN. El precipitado se lavó dos veces con etanol frío al 70% y resuspendido con agua milliQ Estéril RNasa-free. El contenido de ARN y la pureza se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro para microplacas EPOCH con Take3™ *Micro-volume Plate* (BioTek - California, USA), teniendo en cuenta que una unidad de A260 equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN. Además se estimó la pureza haciendo lecturas a 280 nm y se obtuvo el cociente A260/A280. Valores cercanos a 1.8-2 indican una baja contaminación de la muestra.

#### **Trascrición reversa.**

Se incubaron 2  $\mu\text{g}$  de ARN con la DNasa I por 15 min a temperatura ambiente con el fin de eliminar alguna posible contaminación con ADN genómico. Luego se añadieron los *primers random hexamers*, deoxinucleótidos y la transcriptasa reversa M-MLV (volumen final 25  $\mu\text{l}$ ). Se utilizó el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) en un solo ciclo: 6 min a  $25^\circ\text{C}$ , 60 min a  $37^\circ\text{C}$ , 18 min a  $70^\circ\text{C}$  y 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . El ADNc (ADN complementario) se diluyó con agua milliQ estéril y se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### **PCR en Tiempo Real.**

En cada tubo de reacción se agregaron 6  $\mu\text{L}$  de ADNc con 0.375  $\mu\text{L}$  de cada primer 100 $\mu\text{M}$  (**ver tabla de genes analizados**) y 7.5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR Master Mix, y se llevó a volumen final de 15  $\mu\text{L}$  con agua milliQ estéril. En la **Tabla 5** se especifican los genes blancos y las secuencias de cada par de cebadores utilizados. Para cada muestra se realizaron

duplicados. La Real-Time PCR se corrió en el termociclador Rotor-Gene Q siguiendo este protocolo:

Desnaturalización inicial: 10 min a 95°C,

Amplificación (45 ciclos) con desnaturalización 15 segundos a 95°C

Annealing: 30 seg a 60°C

Extensión: 30 seg a 70°C.

Para confirmar la presencia de un único producto, la curva de melting del ADN fue analizada en el rango de los 50-95°C.

### **Semi-cuantificación de ARNm**

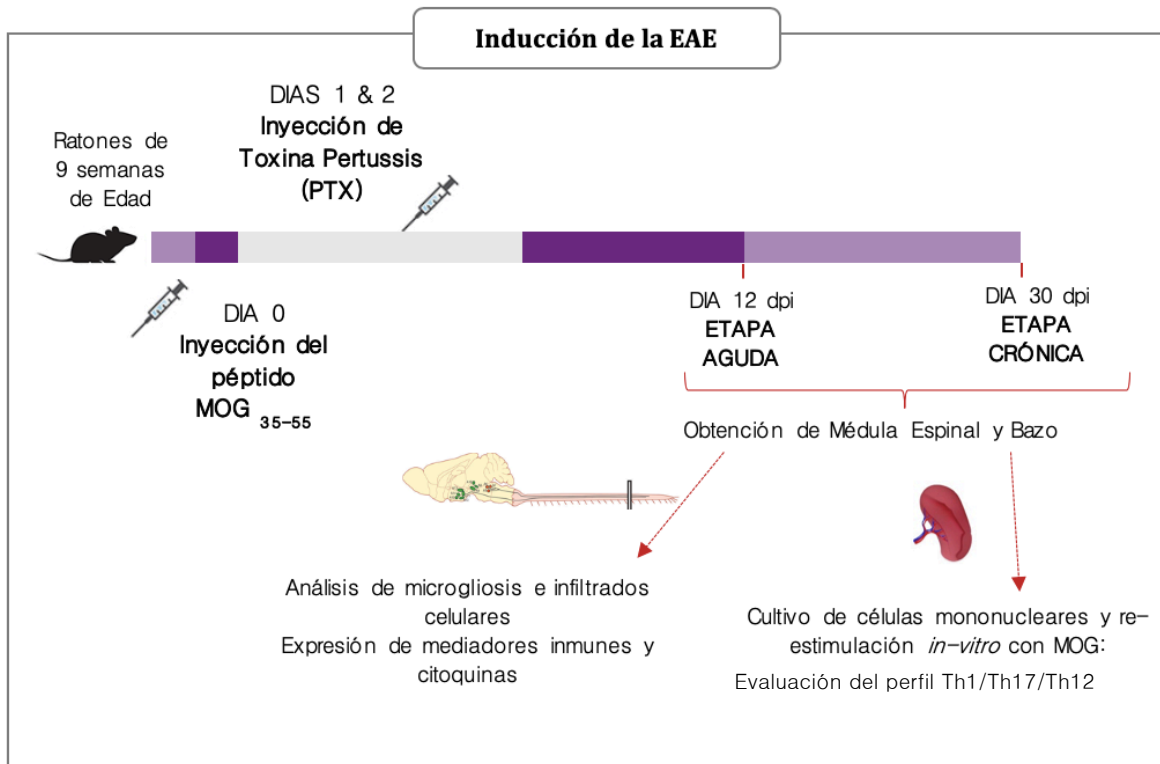
Para la semi-cuantificación se utilizó el método comparativo de CT ( $\Delta\Delta CT$ )<sup>186,187</sup>. Para ello se utiliza un gen de referencia con expresión constitutiva, o sea, genes que se expresan en todas las células y que codifican a proteínas esenciales. Para todos los genes analizados en esta tesis, se utilizó como gen de expresión constitutiva a GAPDH. Primero se calculó la diferencia entre el valor de CT del ARNm de interés y el valor de CT del gen constitutivo. El valor de CT es definido como el ciclo de la reacción de PCR en el cual la señal fluorescente supera un umbral arbitrario, determinado en la zona de fase exponencial de la amplificación. El valor numérico, es inversamente relacionado a la cantidad de amplicones de la reacción (o sea, menos CT, significa mayor cantidad de amplicones).

Para cada gen analizado, los valores de CT se normalizan con los valores de CT del gen de referencia, definiéndose el  $\Delta CT$ . calculado para cada muestra y la muestra de referencia fue luego calculado para obtener el *fold change* o *expresión relativa de ARNm*.

$$\text{Expresión relativa de ARNm o Fold change} = 2^{-\Delta\Delta CT} =$$

$$= \left[ (CT_{\text{del gen de interés}} - CT_{\text{del gen control}}) \text{ muestra A} - (CT_{\text{del gen de interés}} - CT_{\text{del gen control}}) \text{ muestra B} \right]$$

## DISEÑO EXPERIMENTAL PARTE II: EVALUACIÓN DE RESPUESTAS NEUROINMUNES EN MUTANTES MECP2 INMUNIZADOS CON MOG



**Figura 12. Diseño experimental para la inducción de la EAE.** Posterior a la genotipificación de los ratones, animales WT y MUT de 9 semanas de edad se inmunizaron con el péptido de MOG en adjuvante de Freund, o sólo con adjuvante de Freund (controles). En el día de la inducción y 48 h posteriores, se inyectaron con la toxina de Pertussis. Los signos clínicos se analizaron diariamente y se sacrificaron a los 12 y 30 días post-inducción (etapa aguda y crónica respectivamente). Se obtuvieron las médulas espinales lumbares y bazo con el fin de realizar distintos ensayos.

## MÉTODOS PARTE II: EVALUACIÓN DE RESPUESTAS NEUROINMUNES EN MUTANTES MECP2 INMUNIZADOS CON MOG

### INDUCCIÓN DE LA EA (ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL)

Ratones macho WT y MUT para MeCP2 de 9 semanas de edad, se inmunizaron subcutáneamente en ambos flancos internos con 200  $\mu$ l del péptido MOG<sub>35-55</sub> en emulsión con adyuvante completo de Freund (CFA). El péptido se disolvió en agua estéril a 2mg/mL y se emulsionó en una proporción 1:1 con el adyuvante suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* (4mg/mL). Dado que el potencial inmunogénico del péptido de MOG no es suficiente para inducir la enfermedad, se usa el adyuvante completo de Freund. Sus componentes activan fagocitos mononucleares que inducen la fagocitosis de estas moléculas seguido de la producción de citoquinas. Como consecuencia, se prolonga la presencia del antígeno y se produce un transporte efectivo del mismo al sistema linfático. A los ratones control, se inyectaron con una emulsión conteniendo el adyuvante completo de Freund y agua milliQ. A su vez, la inducción de la EAE es facilitada por el uso de la *Toxina Pertussis* que modula la integridad de la barrera hematoencefálica y la respuesta inmune. Por ello, adicionalmente, se inyectaron intraperitonealmente a todos los ratones con la toxina *Pertussis* (100  $\mu$ l/ratón) en una dilución de 10  $\mu$ g/ml, el día de la inmunización y 48 h posteriores. De esta manera, los grupos experimentales quedaron designados como **WT-CFA**, **MUT-CFA**, **WT-EAE**, **MUT-EAE**.

Se analizaron los signos clínicos de cada ratón EAE y CFA diariamente a partir del 4 dpi. Se sacrificaron a los 12 dpi (durante la etapa aguda) o 30 dpi (etapa crónica). Los signos clínicos se evaluaron teniendo en cuenta la escala especificada en la **Tabla 3**. Un score de 0 significa ausencia total de signos clínicos y un score de 8 corresponde al de máxima gravedad, caracterizado por la pérdida de movimiento y tono muscular en cola y ambas patas traseras. Se realizó la asignación de puntaje sumando por separado los signos clínicos para cola (de 0 a 2) y cada pata trasera por separado (de 0 a 3 para cada pata).

**Tabla 3.** Especificación de scores clínicos para la cola y patas traseras en ratones inmunizados con MOG. Signos clínicos tienen un mínimo de 0 (cuando no hay signos clínicos visibles) y máximo de 8 (cuando hay parálisis total desde la región medial del cuerpo hasta la cola).

<b>Cola</b>	0	Sin signos
	1	Parálisis parcial o espasticidad
	2	Parálisis total
<b>Patas traseras (x2)</b>	0	Sin signos
	1	Debilidad al caminar o anormal
	2	Arrastra piernas pero con movimiento residual
	3	Parálisis total

Se realizaron distintas curvas de signos clínicos en relación a los días post-inducción en ratones inmunizados en las semanas 8, 9 y 10 de edad (datos no mostrados). Al realizarse distintas curvas de respuesta en cada caso, observamos que animales inmunizados a las 9 semanas de edad mostraron mayor incidencia de la enfermedad y signos clínicos más homogéneos entre animales. Teniendo en cuenta tales observaciones, se prosiguió a la inmunización en la semana 9 de edad para todos los grupos experimentales. Con el fin de determinar el periodo agudo y periodo crónico a partir de pruebas piloto, se realizó la observación de los signos clínicos durante 56 días. Se determinó que el sacrificio de ratones durante la **etapa aguda** sea a los 12 días post-inducción (12 dpi) y la **etapa crónica** a los 30 dpi ya que a partir de este día los signos clínicos prácticamente no se modificaron durante los 26 días posteriores de análisis. Cabe aclarar que, dado que los ratones del modelo MeCP2-MUT suelen mostrar alteraciones motoras generalizadas en etapas post-sintomáticas (posteriores a la semana 10 de edad), el análisis y graduación de los síntomas clínicos se realizó de manera minuciosa determinándose así la capacidad de caminar, el grado apertura de patas traseras, la capacidad de agarre, etc. Este análisis se realizó antes de comenzar con la observación de signos clínicos típicos de la EAE y durante el desarrollo de los experimentos, siempre observados y comparados con los animales MUT controles que no desarrollan la EAE (MUT-CFA).

Para caracterizar el desarrollo y la severidad de la EAE, se calcularon distintos índices. Entre ellos, el **máximo score clínico promedio** (MSCP) que es la suma del score clínico más alto alcanzado por cada ratón durante la etapa aguda de la enfermedad, dividido por el número total de ratones que se enfermaron en ese grupo. El **día de inicio**, es el día post inducción en el que se observaron los primeros signos clínicos. El **Índice de enfermedad**

**acumulado**, es la sumatoria de todos los scores clínicos de cada animal dividido por el número total de animales en ese grupo experimental.

### **PREPARACIÓN DE TEJIDOS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOLOGÍA**

#### **Perfusión**

Ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina:xilacina 2:1 (65mg/kg y 10mg/kg, respectivamente). Con el fin de fijar el tejido se realizó una perfusión utilizando una bomba peristáltica P-3 (código 19-0626-01, Pharmacia, Estocolmo, Suecia), con mangueras de goma de 1 mm de diámetro interno (1 mm de espesor) y agujas de puntas romas de 21 G. La misma se realizó a través del ventrículo cardíaco izquierdo. Se lavó la sangre con 20 ml de PBS a 4°C. A continuación, se fijó el tejido con 20 mL de paraformaldehído (PFA) 4 % en PBS a 4°C. Se realizó una separación de la sección torácica y lumbar con un bisturí teniendo en cuenta los segmentos vertebrales T11-T12 que corresponde a los segmentos L1-L2 de médula lumbar<sup>188</sup>. Posteriormente, la médula espinal torácica y lumbar fueron extraídos de la cavidad vertebral e incubados en PFA 4 % en PB a 4°C por 24 h. Para su crioprotección, los tejidos fueron pasados a soluciones de sacarosa de concentración creciente (15% y 30% en PBS) hasta que decantaran al fondo del recipiente. Finalmente, fueron embebidos en medio de montaje Cryoplast (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y conservados a -80°C.

La perfusión de los distintos grupos experimentales de animales se realizó a distintas edades post-natales de acuerdo al experimento realizado. Para los experimentos utilizando el modelo de la EAE se sacrificaron y perfundieron a los 12 días post inducción (etapa aguda) y a los 30 días post inducción (etapa crónica).

#### **Preparación de las criosecciones**

Secciones coronales de médula espinal en la región lumbar de 20 µm de espesor fueron cortadas con criostato (Modelo HM525 NX, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) y adheridas a portaobjetos de vidrio previamente silanizados. Para cada médula se utilizaron 12 portaobjetos conteniendo cada uno 6 secciones seriadas. De esta manera, en el mismo portaobjeto se representó un segmento de la médula espinal lumbar que abarca 1440 µm del eje rostro-caudal (o septo-temporal) del mismo. Una vez listos los cortes, y posterior a dejarlos por 18 h a temperatura ambiente, se almacenaron a -80°C hasta su uso.

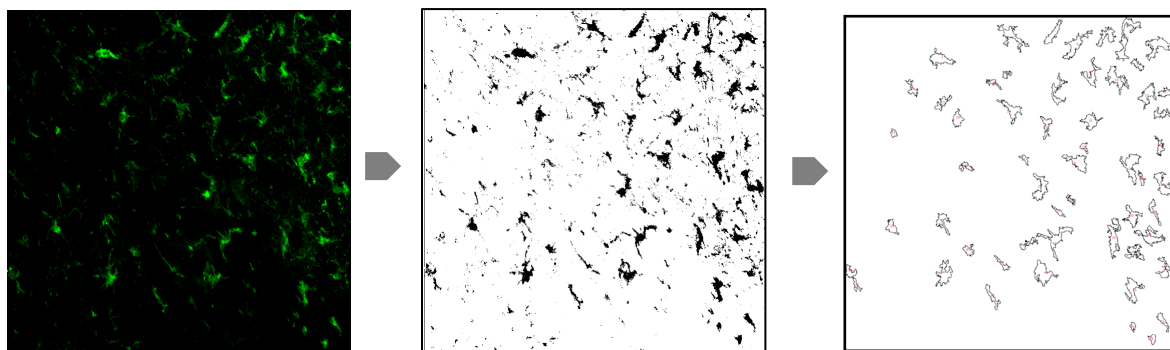
### Inmunohistoquímica para Iba-1

Previo a la marcación, los cortes se dejaron secar toda la noche a 37°C y se comenzó lavando los tejidos tres veces en PBS por 10 min cada vez. Los tejidos se permeabilizaron durante 15 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 0.2% en PBS, y se bloquearon con 4% de SFB, 0.3% de Tritón en PBS por 1h a temperatura ambiente. El anticuerpo primario contra la proteína de unión a calcio (Iba-1) se preparó en una dilución 1:500 en buffer de bloqueo (anti-Iba-1: hecho en cabra. Fabricado por Abcam. *Cat. Ab107159*) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Todas las incubaciones se efectuaron en una cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron 2 lavados de 10 min en PBS y se prosiguió a incubarlos con el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-goat, 1:1000. Hecho en burro. Fabricado por Thermofisher. *Cat. A-11055*) diluido en PBS por 1h a temperatura ambiente, pasado ese tiempo se incubaron 5 min con DAPI 3  $\mu\text{M}$  diluido en PBS. Antes de su montaje, usando Mowiol, se realizaron dos lavados en PBS por 10 min.

Las imágenes se adquirieron usando un microscopio confocal (Olympus FV1000) usando un objetivo 40X (de inmersión). Para cada corte se tomaron 4 a 5 campos al azar con proyección en Z abarcando 15  $\mu\text{m}$  de grosor a una distancia de 1  $\mu\text{m}$  entre cada imagen. Posteriormente, se analizaron utilizando el programa ImageJ (NIH Java).

### Análisis de microgliosis

A todas las imágenes obtenidas se modificaron substrayendo el fondo y se les aplicó un *threshold* o umbral con el fin de individualizar los somas y proyecciones de las células microgliales. Posteriormente se automatizó el análisis de exclusión de partículas cuyo tamaño sean entre 7-90  $\mu\text{m}^2$ . Finalmente se obtuvieron los parámetros de área total ocupada por Iba-1 (Figura 14).



**Figura. 13. Análisis de microgliosis en criosecciones de médula.** Para el análisis de la microgliosis, medida como área Iba-1+, se tomaron fotografías en proyección Z en distintos campos

al azar en médula espinal en región lumbar. Posteriormente se analizaron a través del software ImageJ en el cuál a todas las imágenes fueorn modificadas de manera idéntica. Se sustrajo el fondo, se aplicó un threshold o umbral para luego realizar un análisis de exclusión de partículas y se obtuvo el área total ocupada por Iba-1.

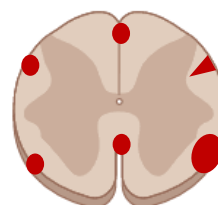
**Tinción con Azul de Toluidina**

Con el fin de determinar el nivel de infiltración de células inmunes en médula espinal en animales EAE, se realizó la tinción con Azul de Toluidina. Las secciones de médula espinal se incubaron en Azul de Toluidina al 0.25% diluido en un buffer ácido (ácido acético 0.88M y acetato de sodio 0.012M) durante 30 seg y posteriormente se lavaron en agua destilada. Los tejidos se dejaron secar y se montaron con DPX. Las imágenes digitales se colectaron bajo un objetivo 20X de un microscopio óptico (Leica DMI8). Los tejidos se evaluaron por infiltrados en diferentes compartimentos anatómicos (meninges y parénquima) y se utilizó una escala de puntajes para evaluar la infiltración basada en el número de focos de infiltrados y la extensión de los mismos (Tabla 4).

Se definió de esta manera el Nivel de Infiltración para cada animal evaluado:

$$\text{Nivel de Infiltración (índice)} = \text{Número de cortes} \times \text{Puntaje de Infiltración}$$

**Figura 14. Análisis de los infiltrados celular en médula lumbar.** Esquema de corte coronal de médula espinal en región lumbar. Los puntos señalados en rojo fueron los focos principales que se hallaron que se tuvieron en cuenta para determinar el nivel de infiltración, igualmente que la profundidad y/o extensión de los mismos (marcado como un triángulo).



**Tabla 4.** Escala de puntuación utilizada para obtener el nivel de infiltrados en médula en los compartimientos de meninges y parénquima se describe en la tabla.

<b>Meninges</b>	0	Sin infiltrados
	1	Pocas células aisladas (sin formar focos)
	2	Dos a 4 focos de células
	3	Abundantes células organizadas en focos
<b>Parénquima</b>	0	Sin signos
	1	Uno o dos focos pequeños
	2	Más de dos focos pequeños o uno extenso
	3	Más de dos focos extensos y/o profundos



### **RT-PCR EN TIEMPO REAL**

Ratones WT y MUT inmunizados con MOG o tratados con CFA, fueron sacrificados por decapitación y se disecaron las médulas espinales en la región lumbar. Inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido y las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su uso. El día de la extracción de ARN, las muestras se homogenizaron utilizando 1 ml de TRIzol y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se llevó a cabo el mismo protocolo especificado en la sección Métodos Parte I.

Los genes analizados fueron: TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , TSPO, CX<sub>3</sub>CR1, CX<sub>3</sub>CL1, FoxP3, e Iba-1. La secuencia de los cebadores o primers para cada gen se hallan especificados en la **tabla 5**.

### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO Y ANÁLISIS DE CITOQUINAS Y PROLIFERACIÓN**

#### **Aislamiento de células mononucleares de bazo**

Bajo condiciones de esterilidad se extrajo el bazo de cada animal y se mantuvo a 4°C en D-PBS estéril con 2% de suero fetal bovino (SFB) y Gentamicina (40  $\mu$ g/mL) hasta el momento de ser procesados. En campana, cada bazo se disgregó utilizando una malla metálica. Posteriormente se incubaron con 6 mL de Buffer de Lisis para glóbulos rojos [Cloruro de Amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 0.15M, Carbonato de Potasio (KCO<sub>3</sub>) 10mM, EDTANa<sub>2</sub> 0.1 mM a pH 7,4] durante 6 minutos y se prosiguió a centrifugar por 10 min a 1,600 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió con D-PBS suplementado con 10% SFB y Gentamicina, y se centrifugaron por un lapso de 10 min a 1600 rpm a 4°C. Este último paso se repitió dos veces. El precipitado de células se resuspendió en RPMI completo [Gentamicina 40  $\mu$ g/mL, SFB 10%, L-Glutamina 2mM], las células se contaron en cámara de Neubauer y se llevó a una concentración final de 2x10<sup>6</sup> células/ml.

#### **Determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos**

Para el medir la concentración de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IL-6, IFN $\gamma$ ) se utilizó el Kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17. Para ello, 1x10<sup>6</sup> CMN aisladas de bazo se cultivaron en una placa de 24 pocillos en presencia o ausencia de MOG (1 $\mu$ g/mL) por 72h. Posteriormente, se aislaron los sobrenadantes de cada pocillo y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

El día del análisis se descongelaron los sobrenadantes en hielo y se prosiguió a centrifugar por 10 min a 4°C a 2000 rpm. Luego, se tomaron 20  $\mu$ L de cada muestra y se

colocaron en tubos nuevos. Luego de agitar bien los *beads* de captura (para cada una de las citoquinas) se realizó una mezcla con cada una de ellas. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  a cada muestra de la mezcla de *beads* de todas las citoquinas y 25  $\mu\text{L}$  del reactivo de detección marcado con PE. Se dejó incubando por 2h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado y se centrifugaron a 200 x g por 5 min. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con 150  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado. Inmediatamente se adquirieron las intensidades de fluorescencia media de las muestras utilizando el citómetro FACS Canto II. Para la determinación de la concentración de cada citoquina, se realizó una curva estándar y se extrapolaron los valores de IFM (Intensidad de fluorescencia media) con las concentraciones conocidas de cada tubo de la curva.

### **Ensayo de proliferación celular**

Las células aisladas fueron cultivadas por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano y se estimularon con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MOG<sub>35-55</sub>. Se incubaron por 24 horas a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. 18 hs previas a la finalización del cultivo, los pocillos fueron pulsados con 20  $\mu\text{L}$  de medio conteniendo 1  $\mu\text{Ci}$  de [<sup>3</sup>H] TdR. Las células fueron cosechadas en papel de fibra de vidrio y se midió la radiactividad incorporada por las mismas usando un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como índice de estimulación (I.E), definido como la relación entre las cuentas por minuto (CPM) promedio de las células estimuladas, respecto de las CPM promedio de las células no estimuladas con MOG.

## **MÉTODOS ANEXO: ANÁLISIS EN CONDICIONES BASALES (sin estímulo inmune)**

### **DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN SANGRE TOTAL**

Se analizó el nivel de ROS en sangre total de ratones a través de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) y para ello se utilizó la sonda 1-hidroxi-3-carboxi-pirrolidina (CPH). La hidroxilamina cíclica es oxidada a un radical nitroxidado, el cual es un reactivo EPR-detectable cuyo nivel de intensidad es indicativo de formación de ROS. CPH es parcialmente permeable en células, por lo tanto, provee información sobre la formación de ROS intra- y extracelular. A través de este método, se detecta la totalidad de ROS en una muestra biológica sin identificar un oxidante específico.

Animales fueron sacrificados por decapitación y la sangre fue recolectada en tubos heparinizados. Rápidamente 100  $\mu$ L de sangre se incubaron con CPH (1mM) por 20 min a 37°C. Luego las muestras se dejaron secar en un tubo de teflón permeable a gas, doblado dos veces, y se insertó en un tubo de cuarzo que se incorporó en la cavidad del EPR. El nivel de intensidad se detectó 23 minutos posteriores a la adición de la sonda.

### **WESTERN BLOTTING**

#### **Obtención de suero de animales MUT y WT**

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (ip) de una mezcla ketamina:xilacina (65 y 10 mg/kg respectivamente) en solución salina y se les extrajo sangre directo del corazón, luego de lo cual fueron sacrificados. La misma se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se colectó el suero y se lo almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **Extracción de proteínas totales de cerebro y cerebelo**

Inmediatamente luego de la disección del cerebro y cerebelo de ratones WT, los tejidos fueron homogenizados en buffer de lisis (HEPES 20mM, sucrosa 0,25M, EDTA 2mM, Pestatina A 1 $\mu$ g/mL, Pefablock 1mM, Leupeptin 5 $\mu$ g/mL) con homogeneizador de vidrio, en una relación peso/volumen 1:4. Se centrifugaron a 800 x g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante correspondiente al homogenato de cerebro y cerebelo. La cantidad de proteínas de las muestras obtenidas fueron cuantificadas con reactivo de Bradford (curva de calibración realizada con soluciones de concentración conocida de BSA).

### **Realización de Geles de Acrilamida**

Se sembraron 200  $\mu$ L de muestra por cada gel (300  $\mu$ g de mielina bovina liofilizada, 600  $\mu$ g de proteínas de homogenato cerebral o cerebelar) y fueron separadas por SDS-PAGE. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% y de 1.5 mm de espesor. La corrida electroforética se realizó a voltaje creciente, desde 120 V a 180 V. Luego, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (poro de 0.45  $\mu$ m) durante 60 min a 350 mA. Posteriormente, las membranas fueron teñidas con Ponceau-S 0.29% y cortadas en tiras de 0.4 cm de ancho.

Para realizar el Western Blot, las tiritas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con BSA al 4% en solución tampón de PBS con Tween20 (PBS con Tween20 0.1%, pH=7,6). Se realizó la incubación de sueros obtenidos de ratones WT y MUT en agitación toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación a temperatura ambiente para luego incubar las membranas con un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM ambos conjugados a peroxidasa en buffer (dilución 1:500 en BSA 1% en PBS) por 2h a temperatura ambiente en agitación; y como control se las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-Sinaptofisina (1:500), la cual es una glicoproteína neuronal de vesículas sinápticas que se expresa en las células neuroendocrinas. Finalmente, el revelado se llevó a cabo por medio de una reacción de color desarrollada con 4-Cl-naftol 0,05% y peróxido de hidrógeno 0,01% en buffer PBS y con agitación constante. La misma fue detenida con el agregado de agua destilada. Luego de varios lavados, las membranas fueron escaneadas con el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Inc., Lin-coln, NE, USA).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Para todos los análisis paramétricos se realizaron previamente las pruebas de homogeneidad de varianza y de distribución normal de datos. Para la determinación de distribución normal de los datos se utilizó el test de Shapiro-Wilks y para la validación de la homogeneidad de varianza se aplicó el test de Levene (en ambos casos se utilizó un  $\alpha=0.05$ ). En aquellos experimentos donde sólo hay una variable entre grupos, se aplicó el test t-Student y ANOVA de uno o dos factores, según corresponda, seguidos por el test *post hoc* de Tukey en experimentos con más de un factor de análisis, cuando la interacción estadística entre los dos niveles de factores resultó significativa ( $\alpha=0.05$ ). Valores de p menores a 0.05 fueron considerados como significativos. El análisis estadístico y los gráficos se realizaron en el programa *GraphPad Prism 7*.

**Tabla 5.** Secuencia de los cebadores o primers utilizados para analizar la expresión relativa de los genes blancos de interés en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) expuestos a distintos estímulos (Parte I) y en médulas de animales MUT y WT expuestos a MOG o sólo a CFA (Parte II).

Gen blanco	SECUENCIA DE LOS CEBADORES O PRIMERS		Tamaño del amplicón (kb)
	<i>pFoward</i>	<i>pReverse</i>	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	CAGGCAGGCAGTATCACTCA	TGTCCTCATCCTGGAAGGTC	86
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	AGCCCCAGTCTGTATCCTT	GGTCACTGTCCCAGCATCTT	113
<b>IL-6</b>	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	102
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	GCGTCATTGAATCACACCTG	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	129
<b>IL-10</b>	CATGGGTCTTGGGAAGAGAA	AACTGGCCACAGTTTTTCAGG	117
<b>TSPO</b>	ACTGTATTCAGCCATGGGGTA	ACCATAGCGTCCTCTGTGAAA	75
<b>Iba-1</b>	GAAGCGAATGCTGGAGAAAC	GATCTCTTGCCCAGCATCAT	135
<b>CX<sub>3</sub>CL1</b>	CGGTGCTATCTGCCCTATGT	CGGAGAGCTCCAGAAAACAC	121
<b>CX<sub>3</sub>CR1</b>	CAGCATCGACCGGTACCTT	GCTGCACTGTCCGGTTGT	65
<b>CD206</b>	CAAAAAGTACTGGGCTTCC	GCCCTTGATTCCAAAGAGTG	101
<b>iNOS</b>	GTTCTCAGCCCAACAATAACAAGA	GTGGACGGGTGCATGTCAC	127
<b>ARG-1</b>	TGGCTTGCGAGACGTAGAC	GCTCAGGTGAATCGGCCTTTT	160
<b>FIZZ1</b>	TGGCTTGCGAGACGTAGAC	ACCCAGTAGCAGTCATCCCA	108
<b>FoxP3</b>	GCTGATCATGGCTGGGTTGT	GGCCCTTCTCCAGGACAGA	112



# RESULTADOS



## Parte I: ESTUDIOS *IN-VITRO*

### CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS PROVENIENTES DE RATONES MUTANTES EN MeCP2

Los macrófagos son células claves para las funciones de la inmunidad innata y adaptativa<sup>189</sup>. Son responsables de procesar antígenos, presentar péptidos a linfocitos T, y reparar tejidos. Pueden actuar de manera directa, ya que destruyen bacterias, parásitos y células tumorales; o de manera indirecta, liberando mediadores que regulan otras células<sup>93</sup>.

Se ha evidenciado que en la patología de RTT distintas poblaciones de macrófagos deficientes en MeCP2 podrían cumplir un rol en el mantenimiento de la patogénesis<sup>42,165,190</sup>.

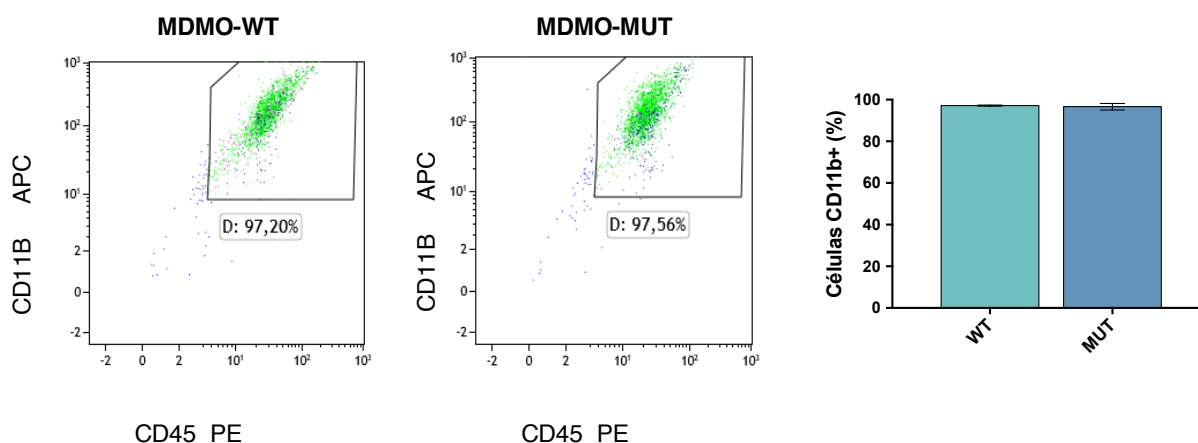
Con el fin de evaluar cómo MeCP2 influencia la función de macrófagos activados de manera clásica o de manera alternativa, usamos macrófagos diferenciados de médula ósea (MDMO) provenientes de un modelo animal de RTT deficiente en MeCP2, que porta una proteína MeCP2 truncada (**MeCP2<sup>308/y</sup>**). El modelo MDMO constituye un cultivo primario homogéneo que es capaz de responder de manera fisiológica a diversos estímulos, por lo que es posible evaluar procesos de diferenciación, proliferación y activación *in-vitro*. Además el procedimiento de aislamiento de precursores es simple, y permite obtener una gran cantidad de macrófagos diferenciados<sup>189</sup>.

**MDMO provenientes de ratones WT y MUT muestran niveles similares de diferenciación.**

Con el fin de determinar si la presencia de MeCP2 mutante afecta el proceso de diferenciación a macrófagos, precursores de médula ósea provenientes de animales MeCP2 WT y MUT se incubaron por 6 días en presencia de M-CFS; posteriormente, se analizó el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup>, marcador de células mieloides, mediante citometría de flujo. En general, se considera que una diferenciación a macrófagos exitosa y un buen nivel de pureza del cultivo se alcanza cuando el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup> es superior al 90%<sup>191,192</sup>.

Al analizar el nivel de pureza, se pudo observar que células obtenidas a partir de la médula ósea de animales MeCP2- MUT no mostraron diferencias significativas respecto a células provenientes de animales WT (**Figura 15**). Esto indica que la mutación en MeCP2 no afectaría el proceso de diferenciación de precursores a macrófagos. El porcentaje de células CD11b<sup>+</sup> obtenido fue entre el 96-98%, indicando un alto nivel de pureza de macrófagos en cultivo para ambos genotipos.

Este resultado sugiere que la diferenciación de precursores de médula ósea a macrófagos en presencia de M-CSF no es afectada por la mutación en MeCP2.



**Figura 15. Nivel de expresión del marcador CD11b en células aisladas de médula ósea y diferenciadas en presencia de M-CSF por 6 días. Porcentaje (%) de células positivas para CD11b como medida de diferenciación de precursores de macrófagos de médula ósea y nivel de pureza del cultivo en presencia del factor M-CSF. Tanto para precursores aislados de animales WT como MUT, el nivel de diferenciación y pureza final fue similar. Los datos se presentan promedio  $\pm$  SEM. Test t-Student.  $p > 0.05$ . N: 4 ratones por grupo experimental.**



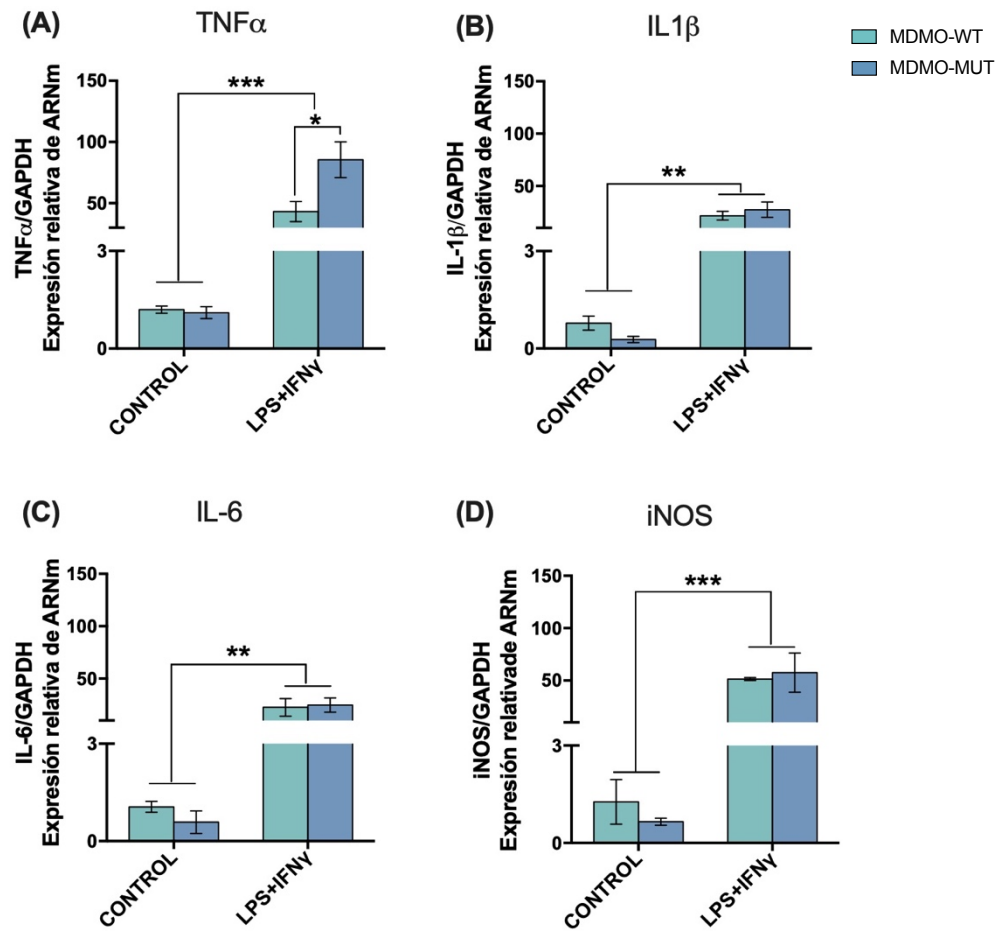
**MDMO-MUT muestran un perfil M1 exacerbado y un déficit de respuestas M2 cuando son expuestos a estímulos polarizantes.**

La activación en macrófagos se evidenció por primera vez al tratarlos con constituyentes bacterianos, como LPS o flagelina e IFN $\gamma$ <sup>92</sup>. Bajo estas condiciones se desarrolla la capacidad de destruir patógenos. Los macrófagos activados de manera clásica (M1) tienen una habilidad incrementada de presentar antígenos ya que aumenta la expresión de MHCII y CD80/CD86. Además, median respuestas inflamatorias al liberar citoquinas y destruir patógenos intracelulares a través de la producción de ON y de otras moléculas efectoras<sup>193</sup>. Por el contrario, macrófagos activados de manera alternativa (M2) al ser estimulados con IL-4 o IL-13, no muestran una respuesta oxidativa y son ineficientes en matar patógenos intracelulares<sup>93</sup>. Sin embargo, aumentan la expresión del receptor de manosa, CD206, el factor de transcripción específico FIZZ1<sup>112,194</sup> y la actividad catalítica de Arginasa-1. Hasta el momento nada se conoce sobre la influencia de MeCP2 en presencia de un estímulo anti-inflamatorio como IL-4.

Dada la gran importancia y amplia variedad de las funciones de macrófagos, su presencia en todos los tejidos y en sangre, y sus diversos perfiles de polarización, quisimos evaluar la respuesta de macrófagos al ser polarizados bajo distintos estímulos, LPS-IFN $\gamma$  (M1) ó IL-4 (M2). Para ello, se procedió a incubar MDMO en presencia de tales estímulos por 4 horas, para luego se analizar la expresión relativa de ciertos genes mediante RT-PCR en Tiempo Real.

Se determinó que en MDMO-WT y MDMO-MUT activados con LPS+IFN $\gamma$  por 4 horas, los niveles de expresión relativa para los genes analizados (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS) aumentaron significativamente con respecto al control, MDMO sin estímulo (**Figura 16**). Es importante mencionar que en tales condiciones basales (sin estímulo) no se observaron diferencias en la expresión de los genes testeados entre los MDMO-WT y los MDMO-MT.

Al analizar el nivel de expresión de TNF $\alpha$  (**Figura 16.A**), se evidenció que MDMO-MUT expresaron mayores niveles respecto a los MDMO-WT cuando estos fueron estimulados con LPS+IFN $\gamma$ , indicando una respuesta pro-inflamatoria incrementada. Por último, el análisis de los niveles de expresión génica para iNOS, IL-6 e IL-1 $\beta$ , no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre MDMO-WT vs MDMO-MUT cuando se estimulan con LPS+IFN $\gamma$ . En conjunto estos resultados indican que la mutación en MeCP2 estaría alterando el perfil de expresión de la citoquina TNF $\alpha$  en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio.



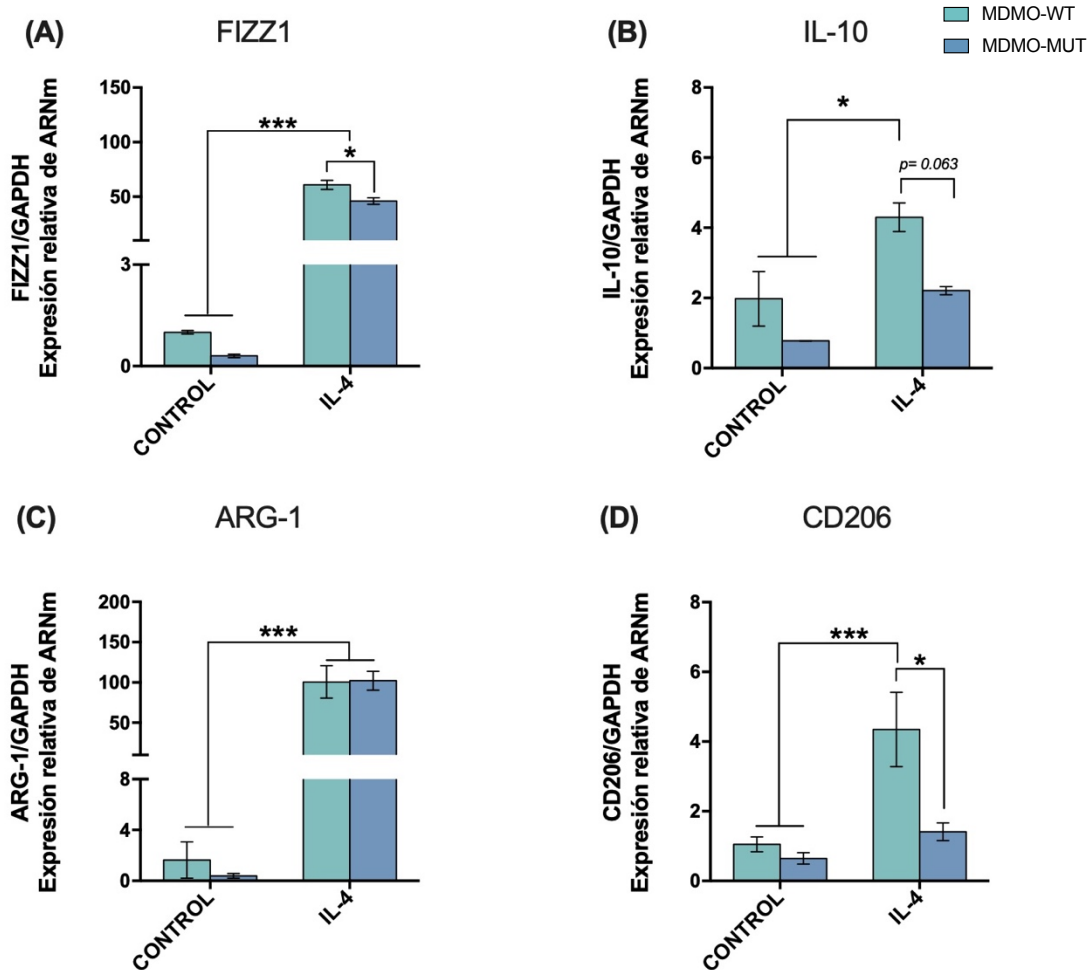
**Figura 16. Expresión relativa de genes prototípicos en respuestas M1.** MDMO fueron estimulados *in-vitro* por 4 horas con LPS+IFN- $\gamma$  y se analizaron los niveles de expresión relativa para (A) TNF $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6 e (D) iNOS. En los gráficos se representa el nivel de expresión de ARNm de los mismos calculado como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Se utilizó como gen de referencia a GAPDH en todos los casos. Para todos los genes analizados, su expresión aumentó en presencia del estímulo (MDMO-MUT y MDMO-WT) respecto a los controles. Se determinó que MDMO-MUT expresaron mayores niveles de TNF $\alpha$  en comparación con los MDMO-WT. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y Tukey post hoc test cuando correspondiera. \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001. N: 3-4 ratones por grupo experimental.

Con el fin de caracterizar el perfil M2 de los MDMO-WT y MDMO-MUT, se analizaron los niveles de expresión génica de la citoquina IL-10, el factor FIZZ1, la enzima Arginasa-1 (ARG-1) y el marcador de superficie CD206 (Figura 17). Para los genes FIZZ1, IL-10 y ARG-1 la expresión relativa en presencia de IL-4 fue mayor con respecto a los MDMO-WT y MDMO-MUT no estimulados (Figuras 17.A, B, y C). El análisis de los niveles de expresión de FIZZ1, mostró que la interacción estadística entre el genotipo y el estímulo resultó ser significativa, ya que MDMO-MUT mostraron menores niveles de expresión en presencia de IL-4 respecto a

los MDMO-WT estimulados (**Figura 17.A**). Al analizar los niveles del transcripto de IL-10, se hallaron diferencias significativas entre genotipos, ya que la expresión fue menor en MDMO-MUT comparado con MDMO-WT (**Figura 17.B**). Por su parte, la expresión de ARG-1 no resultó diferente entre MDMO-WT y MDMO-MUT cuando fueron estimulados *in-vitro* (**Figura 17.C**). Para el caso del marcador de superficie CD206, no se observaron diferencias significativas en MDMO-MUT entre el control no estimulado y los estimulados con IL-4 (**Figura 17.D**). Más aún, la expresión de CD206 en estos cultivos, fue significativamente menor en comparación con MDMO-WT al ser estimulados con IL-4.

Cabe destacar que tres de los cuatro genes analizados en MDMO-MUT al ser estimulados con IL-4, mostraron menor expresión con respecto a los MDMO-WT y que para ningún gen se determinaron diferencias significativas en la expresión entre MUT y WT en condiciones control (sin estimular). Estos resultados sugieren que la mutación en MeCP2 afecta la respuesta anti-inflamatorio/moduladora en macrófagos al alterar el perfil de expresión de genes prototípicos M2.

**En conjunto estos resultados evidencian que existe una desregulación en la expresión de citoquinas y marcadores inmunes en respuesta a distintos estímulos cuando MeCP2 es deficiente, mostrando un perfil pro-inflamatorio exacerbado y una respuesta defectuosa en condiciones polarizantes anti-inflamatorias.**



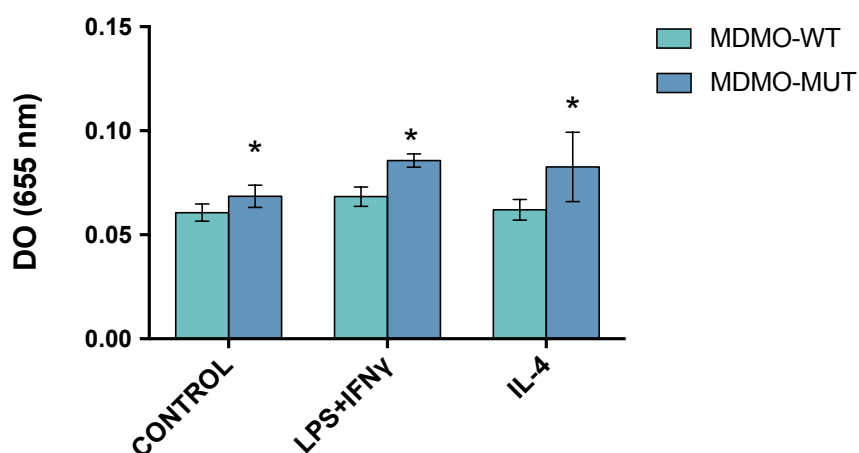
**Figura. 17. Expresión relativa de genes prototípicos en respuestas M2.** MDMO fueron estimulados *in-vitro* por 4 horas con IL-4 y se analizaron los niveles de expresión para FIZZ1, IL-10, ARG-1 y CD206. En los gráficos se representa el nivel de expresión de ARNm de los mismos calculado como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Se utilizó como gen de referencia a GAPDH en todos los casos. **(A)** MDMO-MUT expresaron menores niveles de FIZZ1 con respecto a los MDMO-WT al ser estimulados con IL-4 **(B)** MDMO-MUT expresaron menores niveles de IL-10 en comparación con los MDMO-WT **(C)** No se hallaron diferencias significativas entre los genotipos en condiciones control o al ser estimulados con IL-4 en el nivel de expresión de ARG-1. **(D)** MDMO-MUT no respondieron al estímulo de la IL-4 aumentando la expresión de CD-206 a diferencia de MDMO-WT que aumentaron significativamente su expresión al ser estimulados. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$ . Se realizó ANOVA de dos factores para todos los genes y Tukey post hoc test cuando correspondiera. N: 4 ratones por grupo experimental.

**MDMO-MUT produjeron mayores niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pero no de ON.**

La producción de especies reactivas del oxígeno -como el O<sub>2</sub><sup>-</sup>- y del nitrógeno participan activamente en respuestas M1 actuando como molécula efectora para combatir patógenos<sup>195</sup>. Si la producción de ROS, en particular de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, es excesiva, puede conducir a la oxidación de proteínas, peroxidación lipídica, producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y del radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) que también pueden dañar biomoléculas.

Para determinar si MeCP2 mutada afecta la producción del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, se cultivaron MDMO aislados de animales WT y MUT en presencia de LPS+IFN $\gamma$  ó de IL-4 por 22 h, tiempo suficiente para generar la respuesta dependiente de ROS y subsecuente producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Posteriormente, las células se incubaron con 1 mg/mL de nitroblue tetrazolio (NBT) y los niveles de anión superóxido se midieron de manera indirecta usando un método colorimétrico<sup>185</sup>.

Es importante destacar que los estímulos utilizados (LPS+IFN $\gamma$  e IL-4) no son inductores de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Sin embargo, el análisis de los datos por ANOVA de dos factores reveló una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de O<sub>2</sub><sup>-</sup> entre animales MUT y WT ya que MDMO-MUT mostraron mayores niveles de superóxido en comparación con MDMO-WT en todas las condiciones analizadas (**Figura 18**).

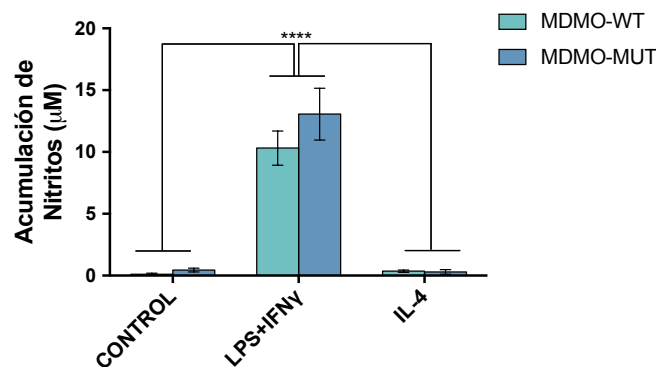


**Figura 18. Niveles del radical superóxido en MDMO estimulados.** Se obtuvieron los valores de DO a 655 nm como medida indirecta del nivel del anión superóxido en macrófagos estimulados con LPS+IFN $\gamma$  ó IL4. Se observaron diferencias significativas en el factor principal -genotipo- ya que macrófagos diferenciados a partir de precursores aislados de animales MUT mostraron mayores niveles de radical superóxido en comparación con animales WT. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. ANOVA de dos factores. \*  $p < 0.05$ . N por grupo experimental: 4.

Por su parte, el ON es una molécula potente que tiene efectos citotóxicos durante respuestas inflamatorias. Dada la importancia del ON como indicativo de activación inmune, se quiso evaluar si MeCP2 podría estar influenciando la producción de este mediador en presencia de diferentes estímulos. Para ello, MDMO fueron incubados en presencia de LPS+IFN $\gamma$  ó de IL4 durante 22 h. Posteriormente, se determinaron los niveles de nitritos en sobrenadantes de cultivos como medida indirecta de la producción de ON.

Se determinó que los grupos controles y estimulados con IL-4 mostraron niveles detectables mínimos de nitritos. Ambos grupos fueron significativamente diferentes al compararlos con los MDMO estimulados con LPS+IFN $\gamma$ . Se determinó que bajo la estimulación con LPS+IFN $\gamma$  se acumularon hasta 12 veces más nitritos en sobrenadantes tanto en MDMO-WT como en MDMO-MUT. En cuanto a la interacción estadística entre los genotipos y el estímulo, no se observaron diferencias significativas, aunque MDMO-MUT en comparación con MDMO-WT incubados con LPS+IFN $\gamma$ , mostraron una tendencia a mayor producción de ON (**Figura 19**). A pesar de tal tendencia en MDMO-MUT, anteriormente se demostró que los niveles de ARNm de la enzima iNOS 4 horas posteriores a la activación de los macrófagos con estímulo inflamatorio, no fue estadísticamente diferente entre MDMO-WT con respecto a los MDMO-MUT (**Figura 16.D**).

**En conjunto, estos resultados sugieren que macrófagos deficientes en MeCP2, poseen mayor capacidad de inducir daño oxidativo y que la respuesta inmune mediada por iNOS y consecuente producción de ON en presencia de un estímulo pro-inflamatorio, no estaría siendo regulada por MeCP2 en estas condiciones.**



**Figura 19. Niveles de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de MDMO.** Se analizó la acumulación de nitritos ( $\mu\text{M}$ ) como medida indirecta de niveles de óxido nítrico producido por MDMO en presencia de LPS+IFN $\gamma$  e IL-4 por 22 horas. MDMO estimuladas con LPS+IFN $\gamma$  mostraron niveles significativamente mayores con respecto a los controles y estimulados con IL-4 independientemente del genotipo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . N: 4 ratones por grupo experimental.

## **CONCLUSIONES PARTE I**

En esta primera parte propusimos evaluar si la mutación en MeCP2 afecta la respuesta inmune en macrófagos. Para ello usamos el modelo *in-vitro* de macrófagos diferenciados de médula ósea y los expusimos a un estímulo pro-inflamatorio y anti-inflamatorio para polarizarlos a un perfil M1 (activados clásicamente) y M2 (activados alternativamente) respectivamente.

Nuestros resultados mostraron que la deficiencia de MeCP2 interfiere con la inducción de respuestas inmunes en estas células, ya que MDMO estimulados con LPS+IFN $\gamma$  respondieron expresando mayores niveles de TNF $\alpha$ , una citoquina prototípica del perfil M1. Por otro lado, cuando MDMO-MUT se estimularon con IL-4, el nivel de expresión de IL-10 fue menor respecto a lo expresado por MDMO-WT. Además, la estimulación con IL-4 en macrófagos MUT no indujo un aumento de expresión del marcador de superficie CD206 o de la citoquina IL-10. Al evaluar niveles del factor FIZZ1, observamos que respondió al estímulo de IL-4 pero su nivel de expresión fue menor en MDMO-MUT.

En conjunto estos resultados indicarían que mutaciones en MeCP2 en macrófagos lleva a una desregulación de la respuesta inmune al mostrar un perfil exacerbado pro-inflamatorio y al interferir con montar respuestas inmunoregulatorias frente a estímulos polarizantes.

También se pudo establecer que en condiciones basales -es decir, independientemente de la estimulación inmune- MDMO-MUT produjeron mayores niveles del O $_2^{\cdot-}$ , indicando que existiría un estado oxidativo exacerbado, al menos provisto por este radical. Por otro lado, se evaluó el nivel de expresión de enzimas asociadas a cada perfil iNOS y ARG-1, para el perfil M1 y M2 respectivamente. Se determinó que en condiciones de deficiencia de MeCP2 no se afectaron los niveles de expresión ninguna de ellas y, en particular para iNOS, tampoco estaría afectando su efecto catalítico, ya que no encontramos diferencias en el nivel de producción de ON en sobrenadantes de estos mismos cultivos de macrófagos MUT.

En conjunto, estos resultados indican que la deficiencia de MeCP2 de macrófagos, altera la respuesta inmune M1 y M2 pero no en condiciones basales, a excepción del O $_2^{\cdot-}$ . Sugiriendo que MeCP2 actuaría de manera directa o indirecta regulando la expresión de marcadores prototípicos para cada perfil, como así también, modulando vías de activación durante el proceso de inducción de una respuesta inmune.



## Parte II: ESTUDIOS *IN-VIVO*

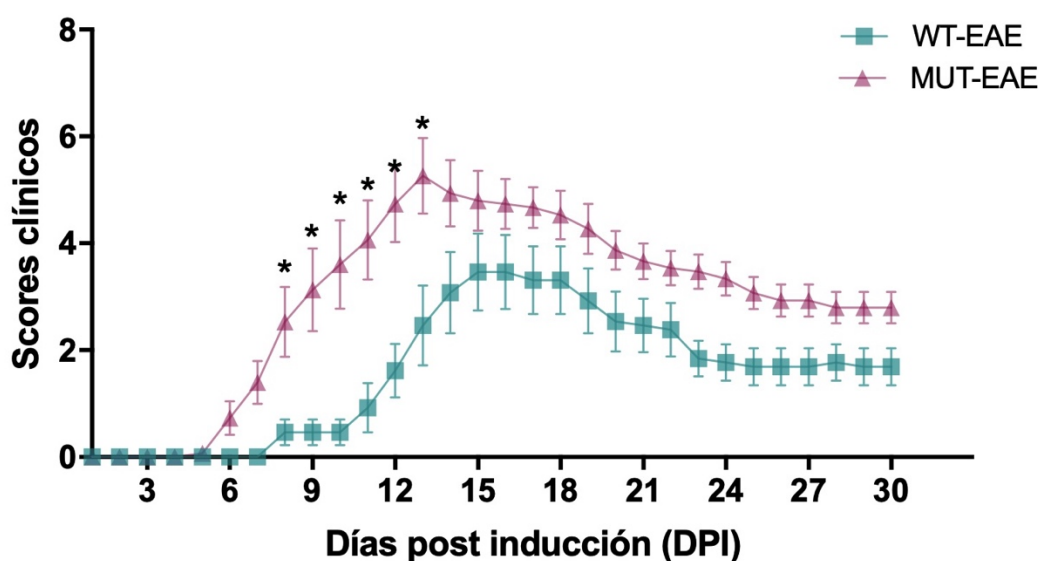
### EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE RESPUESTAS INFLAMATORIAS EN RATONES MUTANTES EN MeCP2 FRENTE A UN DESAFÍO AUTOINMUNE

Se demostró que pacientes con RTT muestran alergias persistentes a alimentos, problemas respiratorios y la presencia de alteraciones en la regulación de la tolerancia autoinmune<sup>1</sup>. Como parte de esta tesis, realizamos estudios orientados a evaluar la presencia de autoanticuerpos séricos en ratones MeCP2 WT y MUT en distintas etapas de desarrollo. Así, en ratones MeCP2 MUT en condiciones basales (es decir sin mediar un estímulo inmune) no fue posible determinar la presencia de autorreactividad diferencial contra componentes del SNC (**Ver Anexo**). Dado que en estudios de función de MeCP2 a nivel del sistema nervioso se demostró que ésta es una proteína dependiente de actividad neuronal, se quiso determinar si MeCP2 participa en la regulación de la respuesta inmune en el contexto de un desafío autoinmune. Con este fin se propuso inducir la enfermedad Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) en animales WT y MUT. Como se dijo anteriormente, la EAE es un modelo animal de Esclerosis Múltiple, en el que se generan respuestas neuroinflamatorias y es un modelo que ha sido muy bien caracterizado, por lo que lo consideramos apropiado para evaluar la participación de MeCP2 en la inducción de ese tipo respuestas inmunes.



**Ratones MeCP2 MUT muestran mayor vulnerabilidad al desarrollo de la EAE**

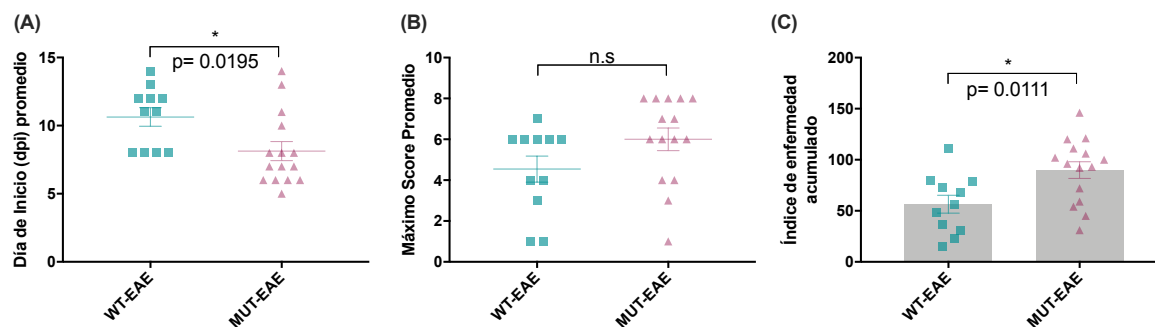
Con el fin de realizar el seguimiento clínico de la EAE, ratones inmunizados con MOG se analizaron diariamente teniendo en cuenta la escala de scores clínicos detallados en la sección de materiales y métodos correspondiente. Es importante destacar que ningún ratón murió como consecuencia de la EAE durante la etapa aguda ni cuando se sacrificaron a los 30 o 56 dpi. Además, ningún animal tratado con CFA desarrolló la enfermedad o mostraron cambios en su capacidad motora posterior a la inducción. En ambos grupos, MUT-EAE y WT-EAE, el inicio de los signos clínicos de EAE se caracterizó por la pérdida del tono muscular de la cola (de manera parcial o total) o en una o ambas patas traseras, sin seguir un orden definido en la aparición de tales alteraciones. Durante la etapa aguda de la EAE, animales inmunizados mostraron signos clínicos variables desde parálisis total a formas más leves, por ejemplo, mostrando pérdida de capacidad motora en una pata o ambas, o en la tonicidad de la cola. Si bien, luego de este periodo todos los animales inmunizados mejoraron su movilidad, no llegaron a una recuperación total ya que mantuvieron un caminar irregular o la cola con espasticidad hasta el momento del sacrificio (30 dpi) (**Figura 20**).



**Figura 20. Evaluación clínica de la EAE.** Ratones WT y mutantes para MeCP2 se inmunizaron con MOG y los signos clínicos se evaluaron diariamente durante 30 días. Ratones MUT-EAE desarrollaron los primeros signos clínicos de la EAE entre el día 6 y 8 dpi, es decir, mostraron un inicio precoz con respecto a los WT. Además, mostraron signos clínicos más severos a lo largo de las etapas aguda y crónica. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas. \*  $p < 0.05$ .

Con el fin de cuantificar el desarrollo y la severidad de la EAE, se calcularon distintos índices (**Figura 21**). El máximo score clínico promedio (MSCP) es la suma del score clínico más alto alcanzado por cada ratón durante la etapa aguda de la enfermedad, dividido por el número total de ratones que se enfermaron en ese grupo (**Figura 21.A**). El día de inicio, es el día post inducción en el que se observaron los primeros signos clínicos (**Figura 21.B**). Por último, el Índice de enfermedad acumulado, es la sumatoria de todos los scores clínicos de cada animal dividido por el número total de animales en ese grupo experimental (**Figura 21.C**).

El análisis de signos clínicos diarios mostró que el inicio de la enfermedad en ratones MUT-EAE es previo a los animales WT-EAE. Ratones WT inmunizados con MOG desarrollaron los primeros signos clínicos alrededor del  $10.64 \pm 0.67$  dpi, mientras que en ratones MUT-EAE el inicio fue significativamente precoz, comenzando en promedio en el dpi  $8.13 \pm 0.69$  (**Figura 21.A**). Además, durante la etapa crónica, ratones MUT-EAE tuvieron una recuperación más lenta ya que se observa que la curva de los scores clínicos entre los días 21 al 30 dpi se mantuvo por encima de la curva correspondiente a los WT-EAE (**Figura 20**). El máximo score clínico promedio no resultó ser significativamente diferente entre animales WT-EAE y MUT-EAE, siendo de  $5.93 \pm 0.53$  y  $4.83 \pm 0.64$  respectivamente (**Figura 21.B**). Sin embargo, el índice de enfermedad acumulado fue mayor para los ratones MUT-EAE (para WT-EAE de  $26.52 \pm 3.14$  y para MUT-EAE de  $49.53 \pm 6.88$ ) (**Figura 21.C**). Cabe destacar que la incidencia de la enfermedad fue total para el grupo de ratones MUT, mientras que para los WT-EAE fue del 84% ya que 11 de 13 ratones desarrollaron la EAE. Por esta razón, los dos ratones WT inmunizados con MOG que no desarrollaron la EAE se descartaron de los análisis posteriores.



**Figura 21. Caracterización de la severidad de la EAE.** Gráficos resumiendo los índices calculados a partir de la información clínica. Datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Para todos los índices, el análisis estadístico se realizó utilizando el test t-Student. **(A)** Máximo score clínico promedio. Se determinó que fue similar en los ratones WT-EAE y MUT-EAE **(B)** Día de inicio de la EAE. Ratones MUT-EAE mostraron un inicio más temprano de la EAE con respecto a los WT **(C)** Índice de enfermedad acumulado. Ratones MUT-EAE también mostraron un mayor índice de enfermedad con respecto a los WT-EAE. N: 13-15 ratones por grupo experimental.

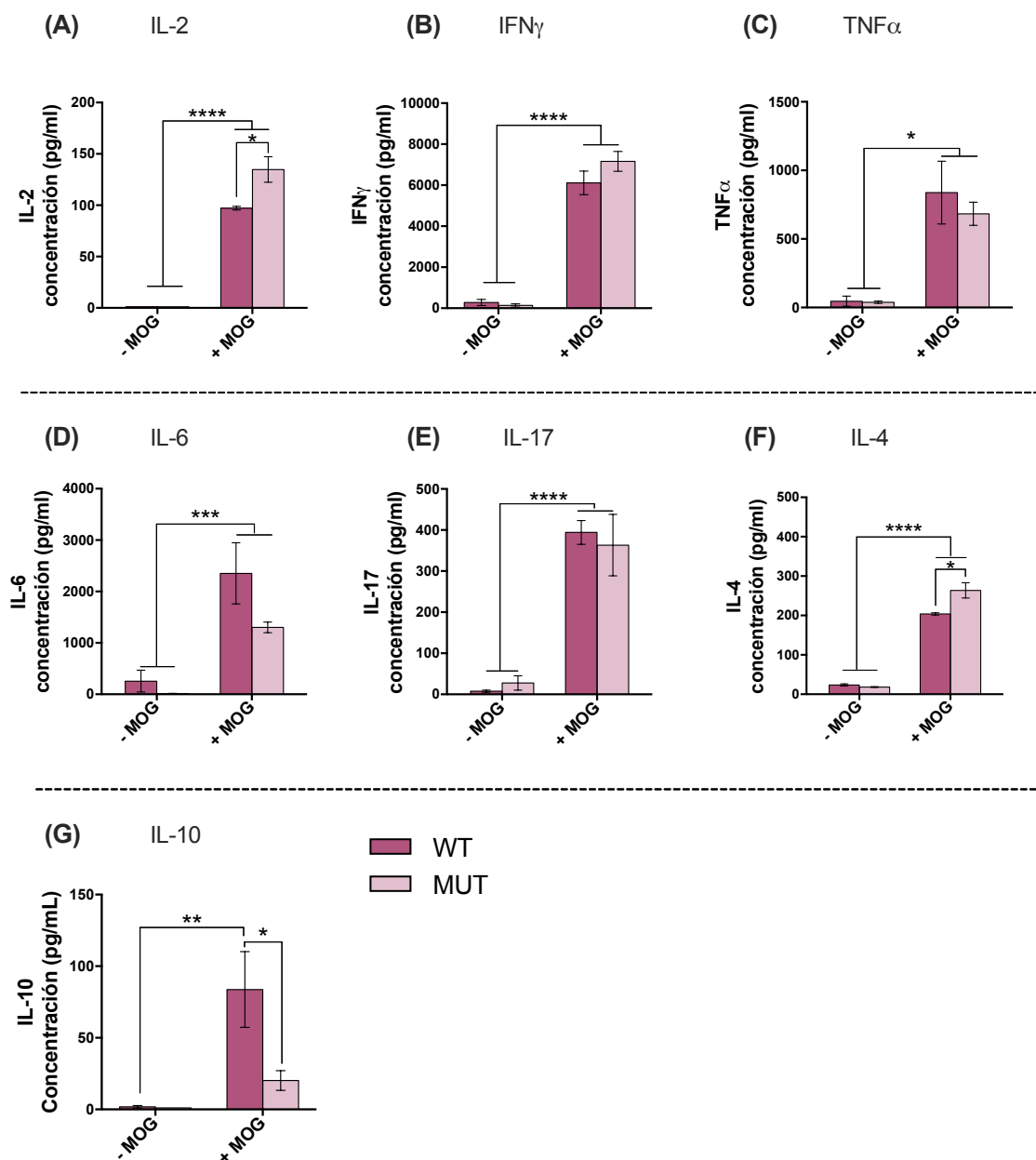
Estos resultados sugieren que animales mutantes para MeCP2 muestran una mayor predisposición o vulnerabilidad a desarrollar la EAE al evidenciarse un inicio precoz de la enfermedad, mayor severidad en los signos clínicos y requirieron más tiempo para la remisión parcial en fase crónica.

### Ratones MUT muestran un mayor perfil inflamatorio periférico persistente

La respuesta inmunológica inicial y el mantenimiento de la EAE se realiza a nivel de los órganos linfáticos. Allí se produce la presentación de antígenos que desencadena la diferenciación y proliferación de distintas poblaciones celulares las cuales, de acuerdo a las condiciones polarizantes, podrán secretar diversas citoquinas y mediadores inmunes<sup>177</sup>. Por ello se quiso determinar si existen diferencias en el perfil inmune y la respuesta específica a MOG en animales deficientes en MeCP2. El conocimiento de este perfil inmune podría esclarecer las diferencias observadas en el desarrollo de la EAE entre animales WT y MUT. Para tal fin, se aislaron células de bazo (células mononucleares, CMN) de animales WT y MUT en etapa aguda y crónica. Posteriormente, se las re-estimuló con MOG *in-vitro* con el fin de determinar la respuesta específica para este antígeno, es decir, la respuesta autorreactiva. Luego de 72 h de incubación, se aislaron los sobrenadantes de cada pocillo y se determinaron las concentraciones de distintas citoquinas (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL2,4,6,10,17) a través del uso de un kit específico para análisis de citoquinas Th1/Th2/Th17 por citometría.

En general, para todas las citoquinas analizadas en sobrenadantes de CMN aisladas de animales CFA, no se detectaron niveles significativos de las citoquinas independientemente de su genotipo y de la re-estimulación *in-vitro* con MOG (+MOG) (datos no mostrados en gráficos). Al analizar los niveles de citoquinas en sobrenadantes de CMN aisladas de animales EAE, se observó una producción significativamente mayor de las mismas en presencia de MOG *in-vitro* en comparación con los controles (**Figura 22**), indicando que CMN-WT y CMN-MUT aisladas de animales que fueron inmunizados para desarrollar la EAE, son capaces de responder específicamente frente a MOG en cultivo. Sin embargo, para las citoquinas IL-2, IL-10 e IL-4, se encontraron diferencias significativas en la interacción estadística entre el genotipo y la estimulación con MOG (**Figuras 22.A, F. y G, respectivamente**). En este sentido CMN aisladas de animales MUT-EAE +MOG, respondieron aumentando la producción de IL-2 e IL-4, lo cual fue significativamente diferente a lo observado con el grupo WT-EAE +MOG. En cambio, para IL-10 se evidenció menor producción por CMN-MUT +MOG respecto a las CMN-WT +MOG.

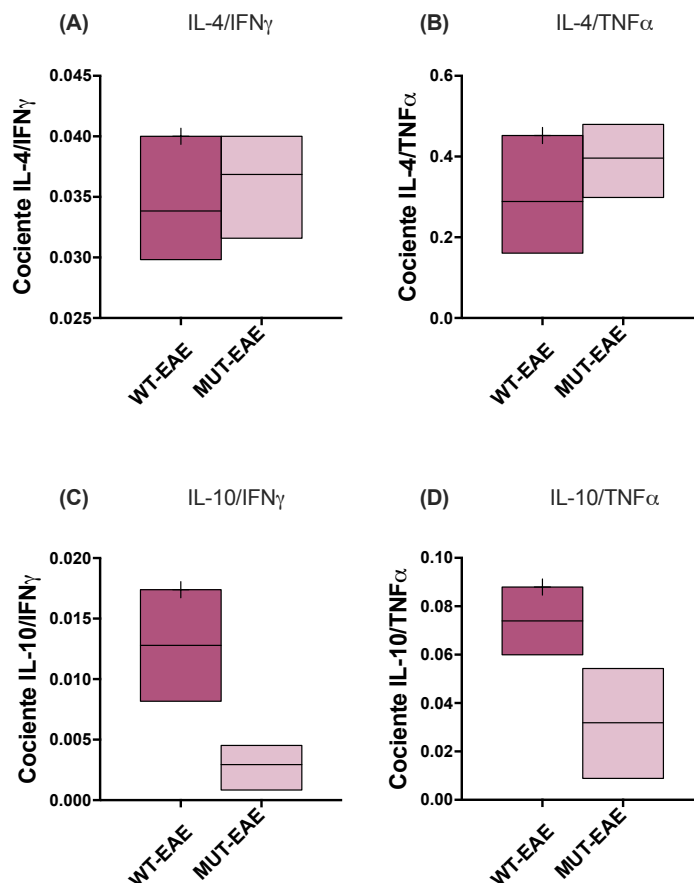
**Este resultado sugiere que CMN aisladas de animales MUT poseen un perfil inmune específico para MOG diferencial con respecto a los WT durante la etapa aguda.**



**Figura 22. Producción de citoquinas por CMN aisladas de bazo en etapa aguda.** La producción de citoquinas por CMN aisladas de bazo de animales WT-EAE y MUT-EAE en presencia o ausencia de MOG en cultivo por 72 horas se determinó en los sobrenadantes mediante el uso de un kit para citometría. Para todas las citoquinas analizadas (A) IL-2 (B) IFN $\gamma$  (C) TNF $\alpha$  (D) IL-6 (E) IL-17 (F) IL-4 y (G) IL-10, la re-estimulación con MOG en cultivo de CMN aisladas de animales EAE, mostraron un aumento significativo en su producción en comparación con la ausencia de MOG en cultivo. Se hallaron diferencias significativas entre MDMO-MUT vs MDMO-WT cuando fueron estimulados con MOG al analizar la producción de IL-2, IL-4 e IL-10. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y Tukey post hoc test cuando correspondiera. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. N: 3-5 ratones por grupo experimental.

Con el objetivo de dilucidar si existen diferencias en el balance de respuestas de tipo anti-inflamatorio (Th2) y pro-inflamatorio (Th1) entre WT-EAE y MUT-EAE, se realizó el cálculo de la relación Th2/Th1 teniendo en cuenta la concentración para las citoquinas IL-4 e IL-10 (anti-inflamatorias) e IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (pro-inflamatorias) (**Figura 23**). Para el análisis de los datos, se realizó un test t-Student que comprobó que no hay diferencias significativas en los cocientes calculados. Este resultado indica que, aunque CMN MUT-EAE produjeron mayores niveles de IL-4 de manera MOG-específica, su influencia en el balance Th2/Th1 no varía entre WT y MUT (**Figura 23.A y B.**). Además, se observó que el cociente calculado entre IL-10/IFN $\gamma$  e IL-10/TNF $\alpha$  en CMN-MUT no resultó significativo, mostrando sólo una tendencia en la relación entre IL-10/IFN $\gamma$  en CMN-MUT menor con respecto a los WT ( $p=0.0736$ ,  $t=3.479$ ) (**Figura 23.C y D**).

**Este resultado indicaría que MeCP2 influencia el perfil inmune pero no alterando de manera significativa el balance Th2/Th1, principalmente mediado por IL-4.**

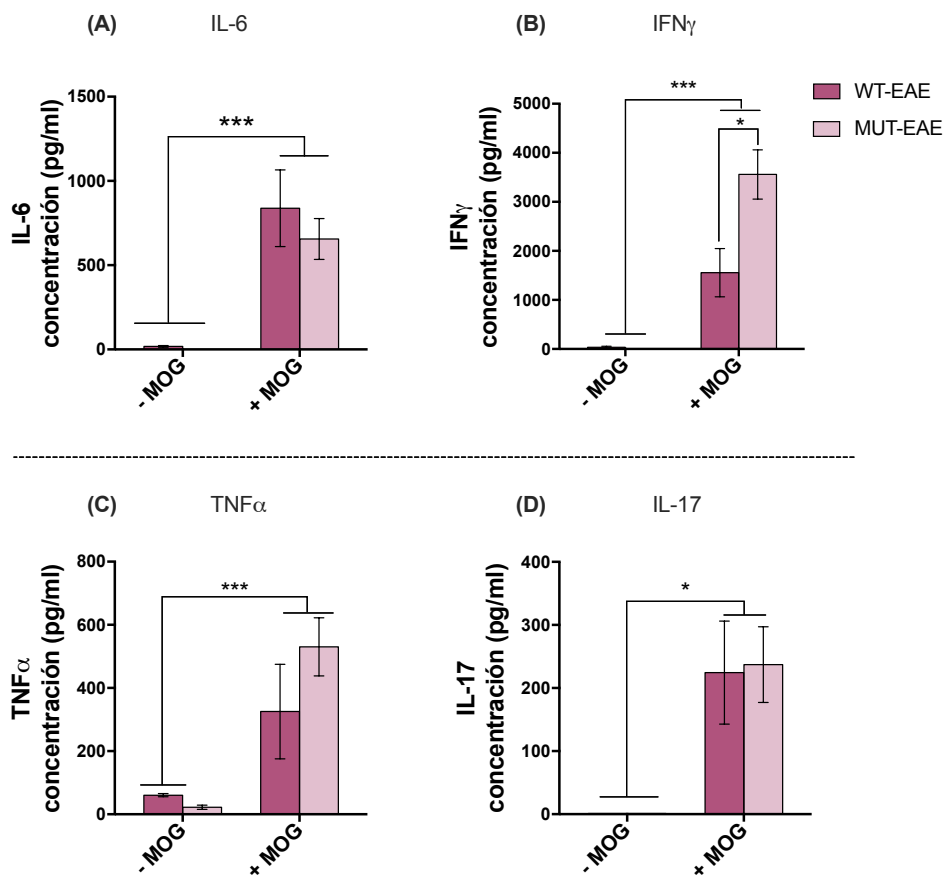


**Figura 23. Balance Th2/Th1 en CMN-WT y CMN-MUT reestimuladas con MOG.** Se calcularon cocientes comparativos entre la producción de citoquinas anti-inflamatorias (*IL-4*, *IL-10*) y las citoquinas pro-inflamatorias (*IFN $\gamma$*  y *TNF $\alpha$* ) de CMN-WT y CMN-MUT reestimuladas con MOG *in-vitro*. Se visualizan los cocientes entre **(A)** *IL-4/IFN $\gamma$*  **(B)** *IL-4/TNF $\alpha$*  **(C)** *IL-10/IFN $\gamma$*  y **(D)** *IL-10/TNF $\alpha$* . En los gráficos de cajas se representan el máximo y el mínimo para cada genotipo, la línea de cada caja indica el valor promedio. Se determinó que no existe una diferencia significativa en los cocientes Th2/Th1 analizados entre WT y MUT durante la etapa aguda. Se realizó un test *t-Student* no apareado. *N*: 3 ratones por grupo experimental.

Durante la etapa crónica, al igual que durante la etapa aguda, para todas las citoquinas analizadas en sobrenadantes de CMN de animales CFA, no se detectaron citoquinas independientemente de su genotipo y de la re-estimulación con MOG (datos no mostrados). Además, no se pudieron observar niveles detectables para las citoquinas *IL-2*, *IL-4* e *IL-10* en ninguna condición analizada ya que el rango de concentración quedó por debajo del límite de detección del kit utilizado.

El análisis de los niveles de  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL-6 e IL-17 en sobrenadantes (**Figura 24**), mostró que existen diferencias significativas entre los grupos control y estimulados con MOG, en este último grupo, mostrando mayores niveles de producción pasadas las 72 h de estimulación. Además, para la citoquina  $IFN\gamma$  se encontraron diferencias significativas en la interacción entre el genotipo y el estímulo en el grupo EAE, ya que CMN-MUT +MOG al compararlo con el grupo WT-EAE +MOG (**Figura 24.B**).

**Estos resultados indican que en etapa crónica la respuesta inmune periférica en animales MUT-EAE es diferencial ya que existiría una respuesta autorreactiva exacerbada en presencia del antígeno específico.**



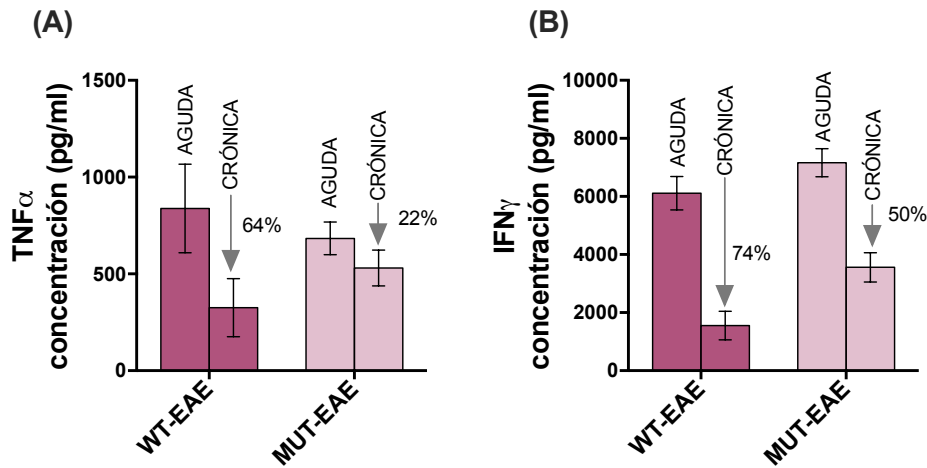
**Figura 24. Producción de citoquinas por CMN aisladas de bazo en etapa crónica.** En los gráficos se representan la concentración de citoquinas producidas por CMN aisladas de bazo de animales WT-EAE y MUT-EAE en presencia o ausencia de MOG en cultivo por 72 horas. Para todas las citoquinas **(A)** IL-6, **(B)**  $IFN\gamma$ , **(C)**  $TNF\alpha$  y **(D)** IL-17, la presencia de MOG (+MOG), indujo la producción con respecto a la falta de estímulo. Se pudo determinar que la producción de la citoquina  $IFN\gamma$  por CMN-MUT +MOG fue significativamente mayor con respecto a las CMN-WT +MOG. Los



resultados se presentan como la promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y Tukey post hoc test cuando correspondía. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . N: 3 ratones por grupo experimental.

Para la citoquina TNF $\alpha$ , no se observaron diferencias significativas en la interacción estadística entre los genotipos y la re-estimulación con MOG (**Figura 24.C**). Sin embargo, está descrito para EAE que desde la etapa aguda y hacia la crónica, los niveles de TNF $\alpha$  deben regularse y disminuir su producción a nivel del SNC<sup>196</sup>. Es decir, la respuesta pro-inflamatoria de células inmunes frente a péptidos de mielina debería disminuir para permitir la remisión parcial, lo cual es característico de la etapa crónica de la EAE. En este sentido, se quiso analizar si a nivel periférico tal regulación era similar entre animales WT-EAE y MUT-EAE. Al analizar la regulación desde la etapa aguda a la crónica, resultó ser menor en CMN aisladas de animales MUT-EAE +MOG, respecto de las CMN-WT +MOG. La disminución en los niveles detectados de TNF $\alpha$  de cultivos de CMN-WT +MOG fue de un 64% desde la etapa aguda hacia la crónica, mientras que para las CMN-MUT +MOG fue sólo de un 22%. De la misma manera, se analizó la regulación en la producción de IFN $\gamma$  desde la etapa aguda hacia la crónica. Se determinó que la producción en CMN-WT +MOG la disminución fue de un 74%, y para los MUT, fue de un 50% (**Figura 25**).

**En conjunto estos resultados sugieren que MeCP2 estaría regulando la autorreactividad de células mononucleares de bazo desde la etapa aguda y hasta la crónica de la EAE, modulando la producción de citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria e inmunoreguladora.**



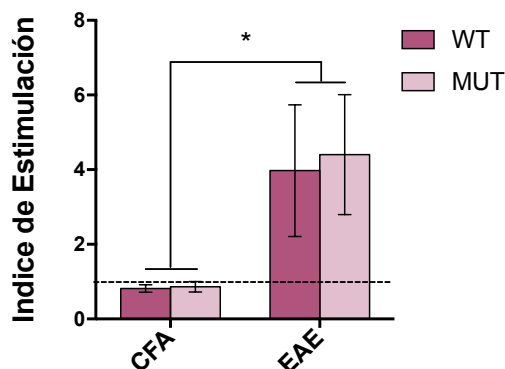
**Figura 25. Regulación en los niveles de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  desde la etapa aguda a crónica.** En los gráficos se presenta la concentración de **(A) TNF $\alpha$**  y **(B) IFN $\gamma$**  durante las etapas aguda y crónica para CMN-WT y MUT expuestas a MOG *in-vitro*. A su vez, se analizó el porcentaje de disminución en la producción de las citoquinas por CMN WT y MUT en presencia de MOG durante la etapa aguda (considerada como el 100%) y la etapa crónica. La disminución de la respuesta pro-inflamatoria de CMN-MUT fue menor respecto a las CMN-WT al ser re estimuladas con MOG. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM.

### MeCP2 no influencia el nivel de proliferación de CMN en etapa crónica

Dado que los niveles de IL-2 fueron indetectables en sobrenadantes de CMN aisladas en etapa crónica, y que la misma está relacionada con la capacidad proliferativa de células mononucleares<sup>197</sup> se procedió a determinar el nivel de proliferación de CMN aisladas de animales en etapa crónica a través de la incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>H) en células en proliferación. A partir de estos datos se obtuvo el índice de estimulación (IE) como medida del nivel de proliferación en cada grupo experimental. Este índice relaciona las cuentas por minuto incorporadas en células que fueron incubadas en presencia de MOG y en ausencia. Para realizar tal comparación, se consideró como nivel basal al valor de IE del grupo experimental WT-CFA.

Al realizar un ANOVA de dos factores se encontraron diferencias significativas en el factor principal, tratamiento, entre CMN-CFA y CMN-EAE. Este último grupo mostró hasta casi 4 veces más de nivel de proliferación, independientemente de su genotipo. En el caso de CMN en ausencia de MOG, no se detectaron niveles significativos de proliferación entre genotipos (**Figura 26**).

Este resultado indica que, durante la etapa crónica de la EAE, el nivel de proliferación antígeno-específica de células inmunes es similar entre animales WT y MUT.

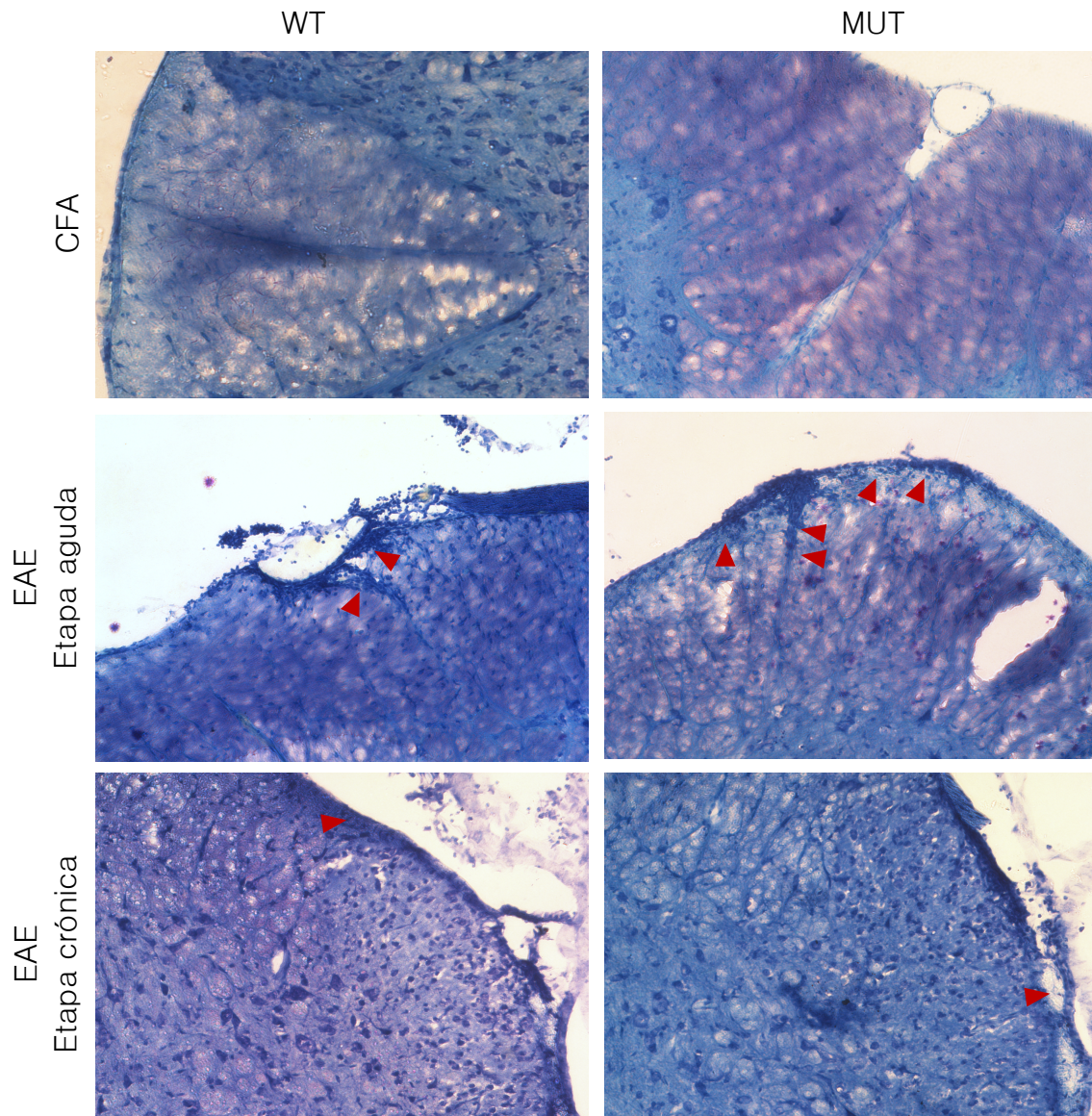


**Figura 26. Nivel de proliferación de CMN aisladas de bazo en presencia de MOG *in-vitro*.** El nivel de proliferación de CMN en presencia de MOG *in-vitro* fue obtenido a partir de las cuentas por minuto (CPM) tomadas en el lector de centelleo como medida de incorporación de timidina tritiada en las células de división en presencia de MOG y en ausencia del péptido. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos, pero sí en el factor principal Estímulo. En presencia de MOG, como es de esperarse, aumentó significativamente el nivel de proliferación de CMN. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Datos se analizaron con un ANOVA de dos factores. \* $p < 0.05$ . N: 4 ratones por grupo experimental.

### Ratones MUT evidencian mayor nivel de infiltrados celulares en médula

La correlación histológica de una enfermedad autoinmune provee información esencial de la patología autoinmune subyacente. La infiltración de células T y células mononucleares en el SNC es una característica clave durante la EAE<sup>176</sup>. Por ello se quiso evaluar si la deficiencia de MeCP2 podría estar influenciando la infiltración de células inmunes al SNC, particularmente a nivel de la médula espinal, órgano blanco de la EAE.

Las lesiones típicas en médula se evidencian por un infiltrado inflamatorio tanto en meninges como en parénquima. El análisis histológico se realizó en muestras obtenidas durante la etapa aguda y crónica de la EAE. Se utilizaron criosecciones de médula espinal lumbar y se tiñeron con Azul de Toluidina (**Figura 27**). Para obtener el nivel de infiltrados de células inmunes en el SNC, se tuvo en cuenta el puntaje correspondiente a cada categoría de infiltración, desde la menos severa (ausencia de infiltrados) a la más severa, cuyo puntaje es 3 (**Ver en Materiales y Métodos**)



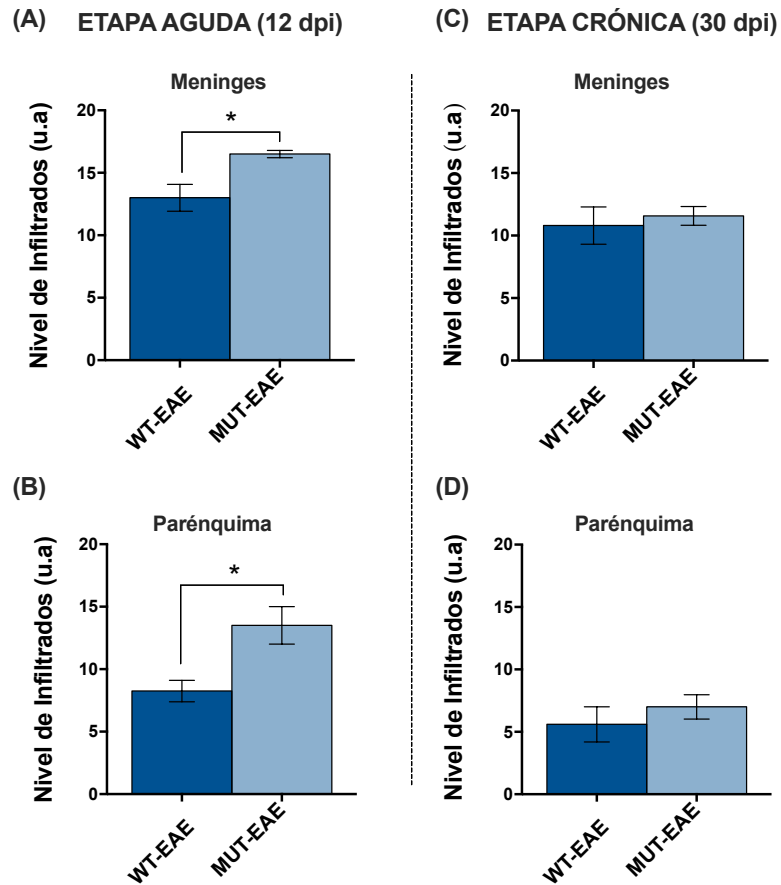
**Figura 27. Marcación histológica de células infiltrantes en médula.** *Criosecciones de la médula espinal lumbar fueron teñidas con Azul de Toluidina y se analizaron para determinar el nivel de infiltrados celulares. El nivel de infiltración se evaluó en meninges y parénquima, teniendo en cuenta la extensión de los infiltrados y el número de focos. En el panel superior se observan dos fotos representativas de médulas obtenidas de animales WT-CFA y MUT-CFA en las que no se identifican infiltrados celulares. En los paneles inferiores se representan médulas de ratones WT-EAE y MUT-EAE en etapas aguda y crónica, en las que se señalan con flechas rojas los típicos infiltrados celulares. Se puede observar que en un mismo campo de la médula de animales MUT-EAE se hallan mayor número de focos de infiltrados, así como mayor profundidad de los mismos en el parénquima medular en la etapa aguda. En la etapa crónica, en ambos grupos, WT-EAE y MUT-EAE, el nivel de infiltrados disminuye y se concentran principalmente a nivel meníngeo. Magnificación: 20X.*

El análisis visual de los cortes histológicos teñidos con Azul de Toluidina demostró que, en ningún animal tratado sólo con CFA en fase aguda y crónica, se hallaron infiltrados. Por lo tanto, tal como se puede observar en el panel de fotografías (**Figura 22**), el tejido de la médula espinal no evidencia células en sustancia blanca correspondiente al parénquima, así como tampoco, en los bordes colindantes, correspondiente a meninges.

En etapa aguda, el análisis de cortes histológicos de médulas espinales obtenidos de ratones MUT-EAE, mostró patrones de infiltración distintos con respecto al grupo WT-EAE; ya que la médula de ratones MUT-EAE evidenciaron significativamente mayor nivel de infiltrados celulares en los compartimientos de meninges y parénquima (**Figura 28.A y B**). Cabe aclarar que en parénquima se halló la mayor diferencia entre MUT y WT inmunizados con MOG, indicando que la infiltración en ratones MUT-EAE fue más severa.

Tanto para animales MUT-EAE como WT-EAE, el nivel de infiltración de células inmunes en médula fue menor en etapa crónica respecto a la etapa aguda y, además, no se evidenció un patrón diferencial de infiltrados en MUT-EAE como se determinó durante esta última etapa. Por lo tanto, en la etapa crónica de la EAE, no se hallaron diferencias significativas en el nivel de la presencia de infiltrados celulares entre MUT-EAE y WT-EAE (**Figura 28.C y D**).

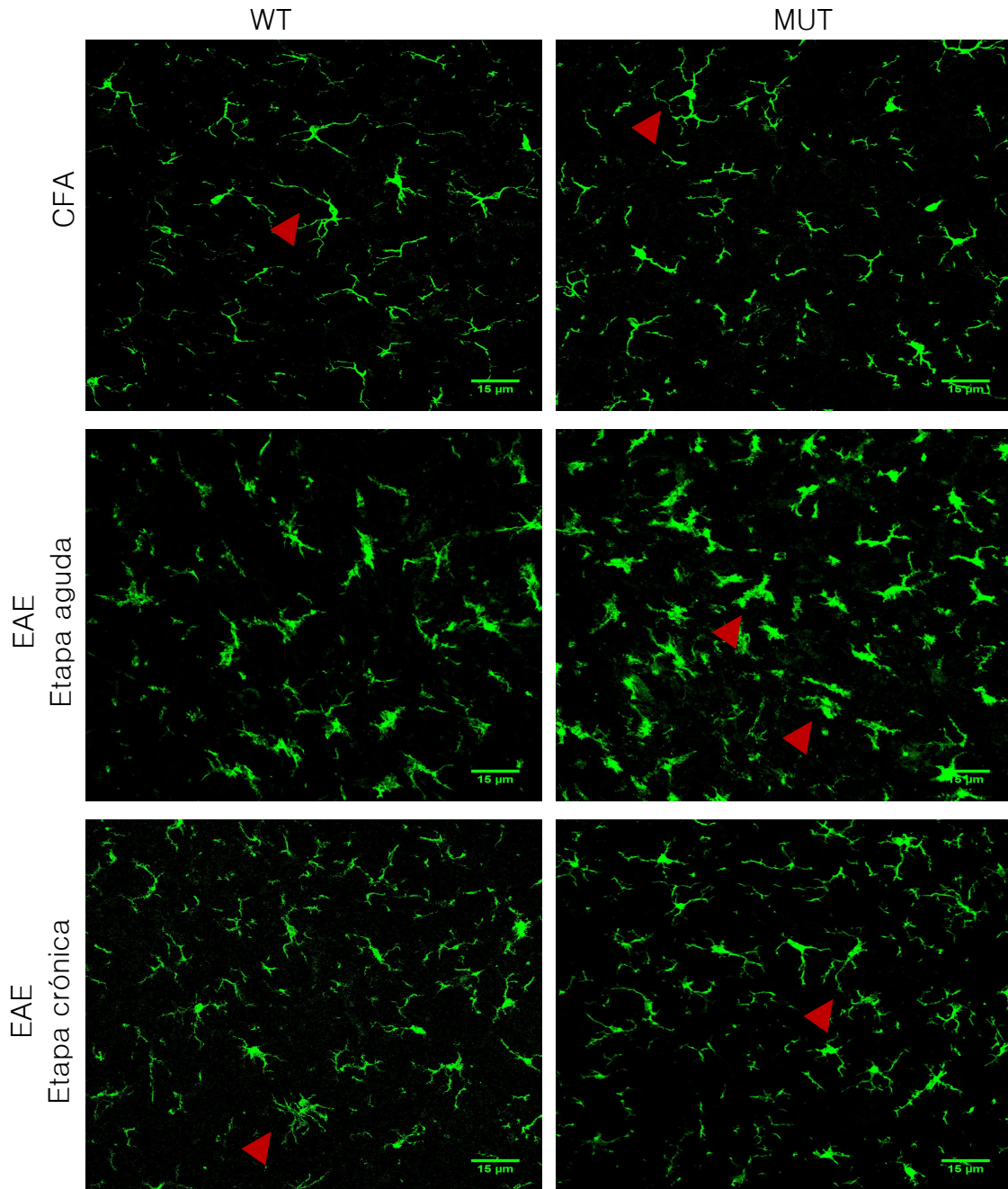
**Esto indicaría que MeCP2 modularía la infiltración de células inmunes en el SNC, durante la etapa aguda de la EAE.**



**Figura 28. Análisis histopatológico en médula.** Criosecciones de médula lumbar se tiñeron con Azul de Toluidina y se determinó el nivel de infiltrados celulares en los compartimientos de meninges y parénquima. Un mayor nivel de infiltrados significa que se hallaron más número de cortes con infiltración severa, durante la EAE aguda y EAE crónica. Durante la etapa aguda, médulas obtenidas de animales MUT-EAE mostraron mayor nivel de infiltrados tanto en **(A)** meninges como en **(B)** parénquima comparado con los WT-EAE. En la etapa crónica, **(C)** y **(D)** los niveles de infiltrados celulares en ambos compartimientos de la médula, fue menor con respecto a la etapa aguda y sin diferencias significativas entre genotipos. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Resultados se analizaron a través de un Test t-Student. \* $p < 0.05$ . N: 5-7 ratones por grupo experimental.

**Ratones WT y MeCP2 MUT muestran niveles similares de microgliosis durante la EAE**

Las células microgliales y los macrófagos son consideradas poblaciones celulares claves para el inicio de la EAE y la progresión en la etapa crónica<sup>198-200</sup>. Estas células adoptan distintos fenotipos (inflamatorios o anti-inflamatorios) que coexisten en el SNC luego de la inmunización con MOG. El balance entre tales fenotipos y la liberación de ciertas citoquinas asociadas podrán facilitar la resolución de la inflamación o mantenerla<sup>200</sup>. Se ha demostrado que MeCP2 se expresa en células gliales y que su ausencia puede alterar la supervivencia y el fenotipo patogénico en ratones mutantes para la proteína<sup>42,201</sup>. En reposo, la microglia muestra un fenotipo morfológico con numerosos procesos delgados extendiéndose desde el soma. Cuando la misma se activa, estos finos procesos se acortan y engrosan resultando en una célula con apariencia ameboides, y en un aumento en la expresión del marcador Iba-1<sup>202</sup>. Por lo tanto, se quiso caracterizar la microgliosis durante la etapa aguda y crónica de la EAE. Para ello, se obtuvieron criosecciones seriadas de médula espinal lumbar, se analizó la expresión de Iba-1 por inmunofluorescencia (**Figura 29**) y se realizó un análisis de imágenes calculando el área positiva para Iba 1.

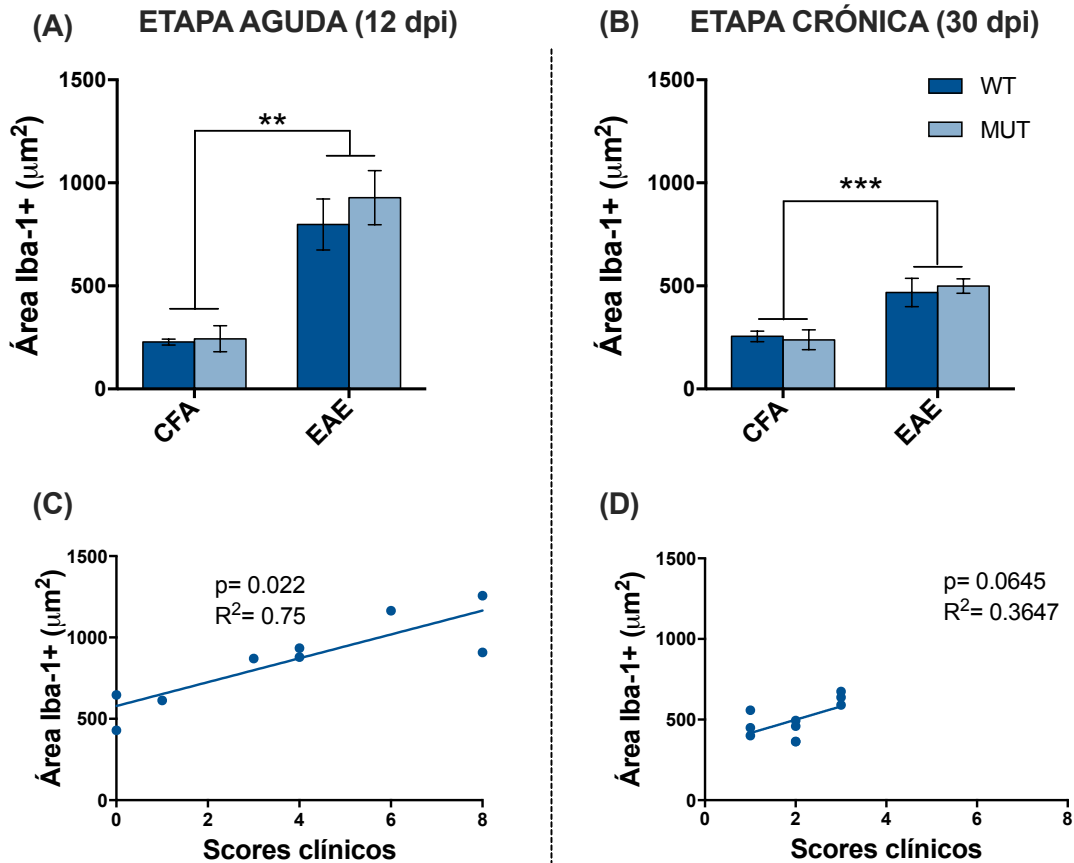


**Figura 29. Marcación por inmunohistoquímica de células microgliales Iba-1+.** Se pueden visualizar en el panel de fotografías criosecciones de médula espinal lumbar de todos los grupos experimentales en etapa aguda y crónica. Se puede distinguir como las células microgliales en los paneles CFA, tienen somas pequeños y proyecciones delgadas. Durante la EAE aguda los somas celulares aumentan su tamaño, sus proyecciones se acortan y se ensanchan -lo cual es característico de la microgliosis y activación microglial- indicadas con las flechas en rojo. En la etapa crónica, las células retoman la morfología en “reposo” y otras aún se mantienen con la morfología “activada”.



Se pudo determinar que, tanto en etapa aguda como crónica, el área Iba-1 positiva (en  $\mu\text{m}^2$ ) fue significativamente mayor en ratones EAE comparado con ratones CFA (**Figuras 30.A y B**), indicando que la expresión de Iba-1 en médula espinal lumbar no es alterado por la mutación en MeCP2. Cabe destacar, que tal como se puede observar en el panel de fotografías (**Figura 29**), aunque no se hallaron diferencias en el área Iba-1+, no se descarta que podrían existir alteraciones morfológicas sutiles en células microgliales de médulas de ratones MUT-EAE, así como posiblemente alterando su función.

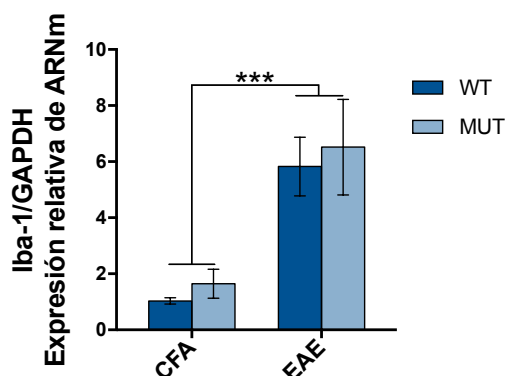
Con el objetivo de determinar si la expresión de Iba-1, medida como área Iba-1+, se relaciona directamente con los scores clínicos en el momento del sacrificio de cada animal EAE en etapa aguda (12 dpi) y crónica (30 dpi), los datos se analizaron a través de un test de correlación de Pearson. Para realizar este test se tuvieron en cuenta los scores clínicos y área Iba-1+ de todos los animales EAE, es decir, la correlación se realizó teniendo en cuenta el conjunto de ratones WT-EAE y MUT-EAE. Se comprobó que existe una correlación significativa entre los signos clínicos evidenciados al momento de la eutanasia y el área total ocupada por Iba1 en los grupos EAE en etapa aguda al analizarse a través de una correlación de Pearson (**Figura 30.C**). Tal correlación no resultó ser significativa entre el área Iba-1+ observada en médulas de animales y los scores clínicos a los 30 dpi (**Figura 30.D**).



**Figura 30. Análisis de microgliosis en médula espinal.** El área total ocupada por Iba-1 (en  $\mu\text{m}^2$ ) se midió realizando un análisis exclusión de partículas por tamaño. En etapa aguda **(A)** y crónica **(B)**, el área Iba-1 positiva fue significativamente mayor en los animales EAE en comparación con los CFA. Se realizó una correlación de Pearson entre los scores clínicos de los grupos WT-EAE y MT-EAE con respecto al área Iba-1 positiva en etapa aguda y crónica. Tal correlación resultó ser significativa entre el score clínicos y el área Iba-1 positiva en animales sacrificados durante **(C)** la etapa aguda, pero no durante **(D)** la etapa crónica. N: 4-5 ratones por grupo experimental. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Con el objetivo de confirmar si existen cambios en la expresión de Iba-1, se procedió a evaluar los niveles del ARNm en médula espinal de animales en etapa crónica a través de RT-PCR en Tiempo Real. Como se determinó anteriormente, al analizar los datos mediante un ANOVA de dos factores, se encontraron diferencias significativas entre animales CFA y EAE **(Figura 31)**. En este sentido, ratones WT-EAE y MUT-EAE mostraron hasta 5 veces más niveles de expresión del transcripto para Iba-1 respecto a los grupos WT-CFA y MUT-CFA, sin observarse diferencias significativas entre genotipos.

Estos resultados sugieren que MeCP2 no estaría influenciando la expresión de Iba-1 y la microgliosis durante la EAE.



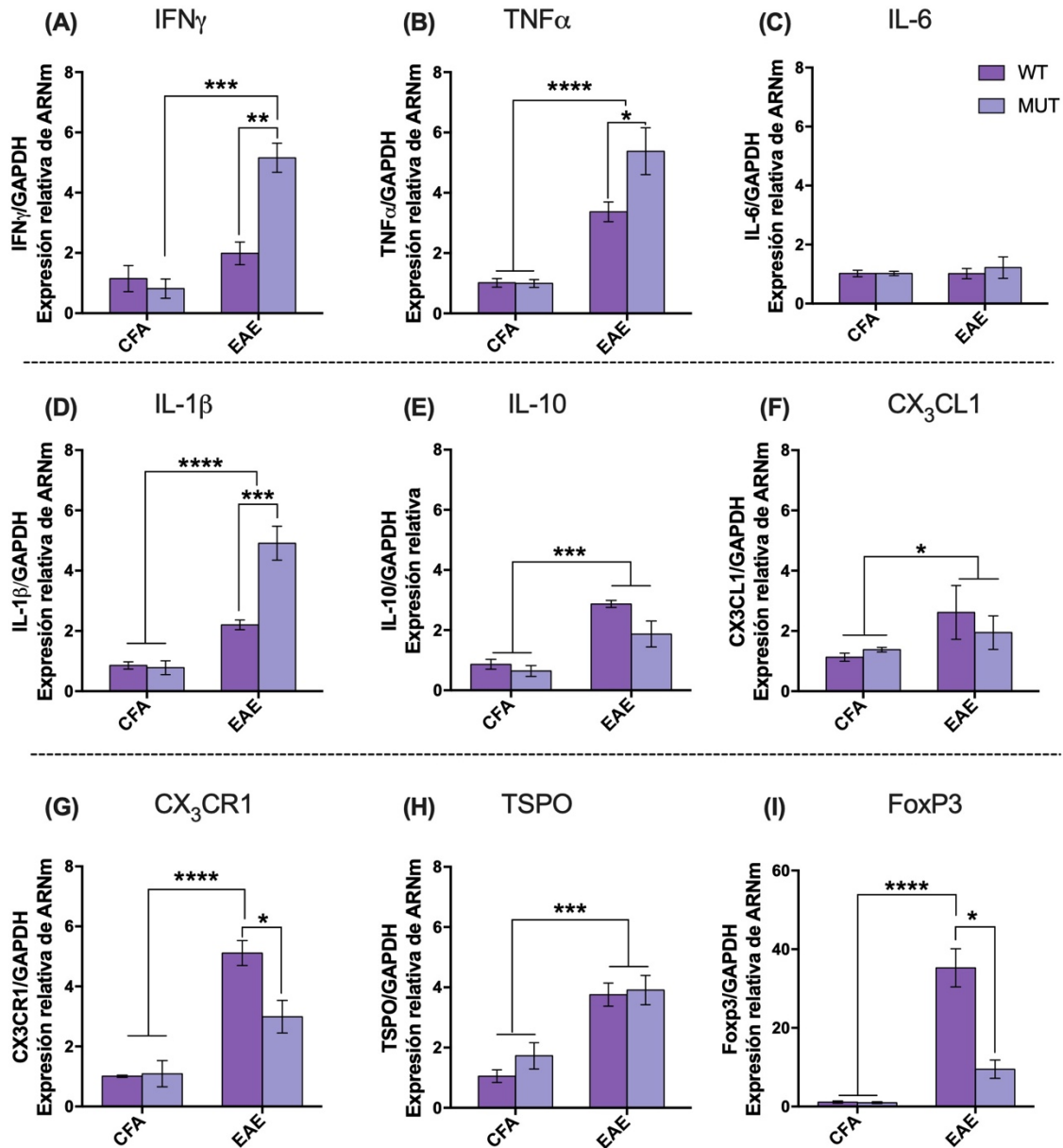
**Figura 31. Expresión génica relativa de Iba-1 en médula.** En el gráfico se representa el nivel de expresión de ARNm calculado como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para Iba-1. Se determinó que el nivel de expresión relativo de Iba1 en médula durante etapa crónica fue mayor en todos los ratones inmunizados con MOG respecto a los CFA y similar entre animales WT y MUT. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores. \*\*\* $p < 0.001$ . N: 6-9 ratones por grupo experimental.

### Ratones MUT muestran un perfil diferencial de mediadores inmune en médula espinal durante la EAE crónica

Los efectos de las células infiltrantes en el SNC durante la EAE, dependen de la liberación citoquinas y quimioquinas que son las responsables de la neuroinflamación<sup>196</sup>. Con el fin de determinar el perfil inflamatorio a nivel de médula espinal durante la etapa crónica de la EAE, se determinaron los niveles relativos de transcritos de distintos genes,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , CX<sub>3</sub>CL1 (fractalquina), CX<sub>3</sub>CR1 (receptor de fractalquina), TSPO o PBR (receptor de benzodicepinas periférico) y FoxP3, que pudieran proveer información sobre el ambiente inflamatorio y regulatorio en animales EAE (**Figura 32**).

Al analizar el nivel relativo de expresión del ARNm de las citoquinas  $TNF\alpha$ , IL-10 e IL-1 $\beta$ , se pudo determinar que existen diferencias significativas entre los animales CFA y EAE (**Figuras 32. B, D y E, respectivamente**). En todos los casos, los niveles relativos de expresión fueron significativamente mayores para todos los animales EAE. Para la citoquina IL-6 no se encontró diferencia significativa entre los ratones CFA y EAE, mostrando una expresión similar y baja en ambos casos (**Figura 32.C**). Para las citoquinas  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  e IL-1 $\beta$ , se observaron mayores niveles de expresión relativa en animales MUT-EAE comparado con el grupo WT-EAE. Por otro lado, al analizar los niveles relativos de IL-10, se detectó una

tendencia en animales MUT-EAE de expresar menores niveles con respecto a los WT-EAE (Figura 32.E).



**Figura 32. Nivel de expresión génica de citoquinas y mediadores inflamatorios en médula.**

A los 30 dpi, ratones CFA y EAE, se sacrificaron y se aislaron las médulas espinales lumbares para llevar a cabo una RT-PCR en Tiempo Real para (A) IFN $\gamma$  (B) TNF $\alpha$  (C) IL-6 (D) IL-1 $\beta$  (E) IL-10 (F) CX $_3$ CL1 (G) CX $_3$ CR1 (H) TSPO e (I) FoxP3. En los gráficos se representa el nivel relativo de expresión de ARNm calculado como 2<sup>-ΔΔCT</sup>. Se utilizó como gen de referencia a GAPDH en todos los casos. Para todos los genes analizados, excepto IL-6, la expresión relativa es mayor en médula de animales EAE respecto a los CFA. Se pudo determinar que el nivel de expresión relativa de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

*CX<sub>3</sub>CR1* y *FoxP3* fue significativamente diferente entre los grupos WT-EAE y MUT-EAE. Para *IL-10* se halló una tendencia en MUT-EAE a expresar menores niveles. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores para el análisis de cada gen y Tukey post hoc test cuando correspondiera. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$ . N: 3-6 ratones por grupo experimental.

Posteriormente se evaluó el nivel de expresión relativa de CX<sub>3</sub>CL1 (fractalquina) y su receptor, CX<sub>3</sub>CR1. CX<sub>3</sub>CL1 es un miembro de la familia de quimioquinas CX<sub>3</sub>C que se expresa en células epiteliales, neuronas, intestinos y pulmón. Su receptor se expresa en abundancia principalmente en monocitos y macrófagos pero también en células T y NK<sup>203</sup>. Se ha evidenciado que la interacción CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 media procesos de migración celular durante la EAE así como la severidad de la enfermedad<sup>204</sup>. Por lo tanto, resulta de gran relevancia evaluar si la mutación en MeCP2 afecta la expresión de la quimioquina y su receptor. En este trabajo sólo se hallaron diferencias significativas en la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 entre animales CFA y EAE (**Figura 32.F**); sin embargo, sí se evidenciaron diferencias significativas en el nivel de expresión de su receptor (CX<sub>3</sub>CR1) entre animales WT-EAE y MUT-EAE. Se determinó que ratones WT-EAE expresaron mayores niveles respecto a los WT-CFA. Sin embargo, entre MUT-CFA y MUT-EAE, no se hallaron diferencias en la expresión ya que en ambos grupos los niveles permanecieron bajos. Es decir, que en ratones MUT la inmunización con MOG no indujo un aumento en la expresión del receptor CX<sub>3</sub>CR1, como se observó en los WT. (**Figura 32.G**).

También se analizó el nivel de expresión de TSPO (*translocator protein 18 kDa*), la cual es una proteína presente en la membrana mitocondrial de múltiples tejidos, y en sistema nervioso, abunda en células gliales. Dado que su expresión es incrementada durante procesos neuroinflamatorios, se quiso determinar si existirían diferencias en su regulación dependiendo del genotipo de los animales inmunizados con MOG<sup>205</sup>. En este trabajo se pudo determinar que la expresión del transcritto de TSPO fue mayor en animales EAE con respecto a los CFA, pero no se hallaron diferencias significativas entre genotipos (**Figura 32.H**).

Por último, se cuantificó el nivel de expresión relativa de FoxP3, el gen maestro de las células T regulatorias con el fin de determinar si existirían alteraciones en la respuesta inmunomoduladora mediada por células que expresan este gen. Se determinó que la inducción de la EAE en animales WT llevó a un aumento de expresión de este gen, pero no así para el caso de animales MUT, en los que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ratones MUT-CFA y MUT-EAE (**Figura 32.I**). A su vez, en animales WT-EAE se hallaron mayores niveles del transcritto de FoxP3 con respecto a lo expresado por

MUT-EAE. Por lo tanto, en ratones MUT la inmunización con MOG no induce un aumento en la expresión de FoxP3 como se observa en animales WT, sugiriendo que MeCP2 es un importante regulador de la respuesta inmunomoduladora.

**Estos resultados indican que MeCP2 estaría involucrada en la alteración del perfil de expresión de mediadores inmunes localmente, es decir, actuando a nivel del tejido blanco (la médula espinal) durante un desafío autoinmune.**

## **CONCLUSIONES PARTE II**

MeCP2 es un factor de transcripción versátil cuya función en el contexto de un desafío autoinmune no ha sido relevada. Con ese propósito, evaluamos los efectos de la deficiencia de MeCP2 en un modelo animal en el cual la proteína MeCP2 se halla truncada, es decir, que mantiene sólo ciertas funciones residuales. La importancia de los resultados obtenidos en esta segunda parte de la tesis reside en la clara descripción de una desregulación en la respuesta inmune *in-vivo* en animales mutantes para MeCP2.

De acuerdo a nuestro estudio se pudo establecer que MeCP2 es un factor necesario para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica al observarse que ratones mutantes inmunizados con el péptido MOG, muestran mayor vulnerabilidad y susceptibilidad para desarrollar la EAE respecto a los WT. No sólo los ratones MUT mostraron un inicio de la enfermedad precoz, sino que también mostraron signos clínicos más severos que animales WT inmunizados. La presentación clínica en la etapa aguda fue además acompañada por un aumento de infiltrados celulares en médula espinal (sitio blanco de la EAE). A nivel periférico se pudo determinar que, durante la etapa aguda de la EAE, CMN aisladas de bazo de animales MUT-EAE, liberaron mayores cantidades de citoquinas pro-inflamatorias (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) y menores de IL-10 en respuesta al autoantígeno MOG, aunque sin hallarse diferencias en el balance Th2/Th1 entre animales WT-EAE y MUT-EAE.

Asimismo, nos interesó evaluar si existían diferencias en el nivel de microgliosis en el sistema nervioso ya que se demostró que cuando MeCP2 está ausente en esta población celular, se ven afectadas funciones relacionadas a ella. El estudio de la expresión de Iba-1 por inmunohistoquímica no mostró diferencias significativas entre animales MUT-EAE y WT-EAE en la etapa aguda y crónica. Si bien al analizar el nivel de microgliosis (área Iba-1 positiva), no se determinaron diferencias significativas en animales mutantes, es posible que la deficiencia de MeCP2 lleve a cambios funcionales en células microgliales y macrófagos durante el desarrollo de la enfermedad. Los resultados de los experimentos *in-vitro* descritos en la Parte I de esta tesis, apoyan esta idea debido que MDMO-MUT mostraron un perfil M1 y M2 alterado respecto a los MDMO-WT. Otras poblaciones celulares son importantes tanto para el inicio como para el mantenimiento de la enfermedad en estado crónico.

Durante la EAE en etapa crónica se pudo evidenciar que animales MUT tardaron más tiempo en alcanzar la recuperación que animales WT. En la médula se pudo observar que, a los 30 dpi, el nivel de lesiones inflamatorias disminuyó con respecto a lo observado en la etapa

aguda, y no se encontraron diferencias significativas en el nivel de infiltración entre animales MUT y WT, al igual que en el nivel de microgliosis. Sin embargo, al analizar el nivel de expresión de genes de citoquinas pro inflamatorias como  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , se pudo determinar que animales MUT mantenían niveles más elevados que los WT. Esto indicaría que existe una alteración en la respuesta inmune a largo plazo, luego de un desafío autoinmune. Tal alteración no fue evidenciada en ningún animal MUT-CFA, indicando que el desbalance inmunológico sería consecuencia de la inmunización con MOG. A su vez, al evaluar el perfil inmunológico periférico en CMN de bazo re-estimuladas *in-vitro* con MOG, se pudo determinar que estas poblaciones celulares mantienen una reactividad exacerbada frente a MOG ya que sólo en su presencia, se liberaron mayores cantidades de  $IFN\gamma$ .

Finalmente, el análisis de expresión génica en médulas espinales obtenidas durante la etapa crónica, determinó que el desbalance de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  también está representado a nivel del SNC. Al mismo tiempo se pudo determinar que ratones MUT-EAE expresaron mayores niveles de  $IL-1\beta$ , y menores de moléculas inmunoregulatorias como  $IL-10$ , FoxP3 y  $CX_3CR1$ . Todo indica que esas diferencias de expresión explicarían en parte los signos clínicos observados y la mayor vulnerabilidad de desarrollar enfermedades inmunes y procesos inflamatorios más severos y persistentes.





**Anexo: ESTUDIOS *IN-VIVO***  
**CONDICIONES BASALES**

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS REACTIVOS Y ROS EN  
RATONES MUTANTES Y DEFICIENTES PARA MECP2 EN CONDICIONES BASALES**

**Mutaciones en MECP2 no influyen en la presencia de anticuerpos reactivos contra proteínas propias del sistema nervioso central (SNC)**

En condiciones fisiológicas, en humanos y otros animales como conejo, ratón o rata, se hallan autoanticuerpos naturales en cantidades detectables en suero de individuos normales. Estos autoanticuerpos naturales que conforman la autoinmunidad natural, son reactivos a moléculas altamente conservadas, como proteínas y ácidos nucleicos. En conjunto conforman una red que sirve para proteger al organismo de daño interno o externo<sup>206</sup>. Sin embargo, un exceso en el desarrollo de una respuesta inmune autorreactiva se relaciona a trastornos autoinmunes, como lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoidea. En particular en pacientes con RTT se ha reportado evidencia sobre la relación entre MeCP2 y una disfunción inmune al establecer un vínculo entre los polimorfismos del gen MECP2 y enfermedades autoinmunes<sup>138-141</sup> así como también a la presencia de autoanticuerpos contra proteínas de cerebro en suero. De hecho, se ha reportado un caso, en el que el diagnóstico de una mutación en MeCP2 en una niña de 3 años, fue consecuencia de la presencia de anticuerpos anti-MOG que inicialmente fue diagnosticado como encefalomiелitis<sup>207</sup>.

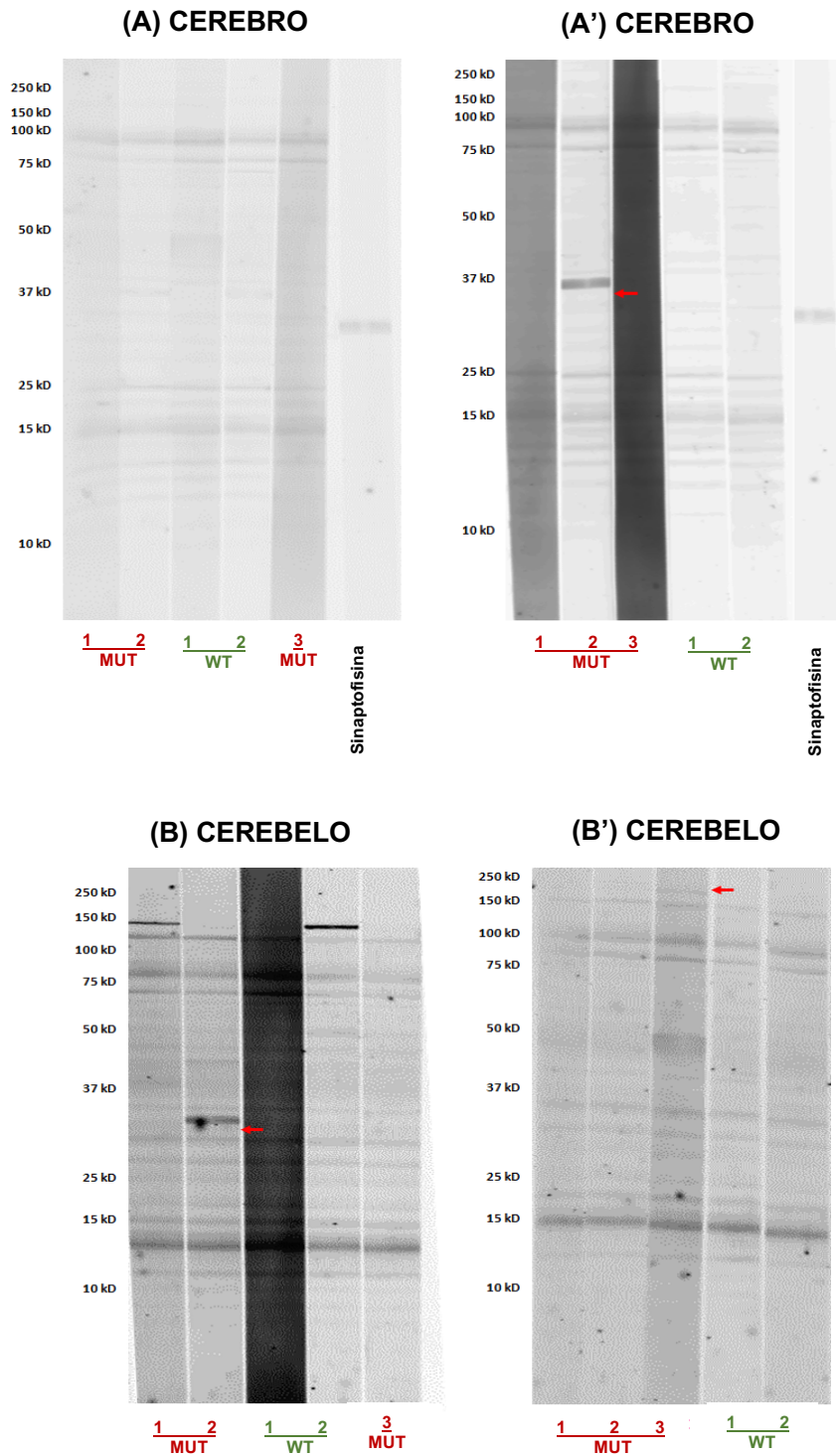
Considerando estos antecedentes y la poca información al respecto en el modelo MeCP2-MUT, se evaluó si en ratones mutantes para MeCP2, existen autoanticuerpos reactivos contra antígenos propios de cerebro, cerebelo y mielina como indicador de posibles

alteraciones en la tolerancia inmunológica<sup>1,143,208</sup>. Para tal fin, se extrajo sangre de ratones machos MUT y WT (4 semanas post-natales) y post-sintomática (7 semanas post-natales). Se aisló el suero con el fin de ser incubados con proteínas del SNC que fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se usaron anticuerpos contra IgG e IgM respectivamente como anticuerpos secundarios.

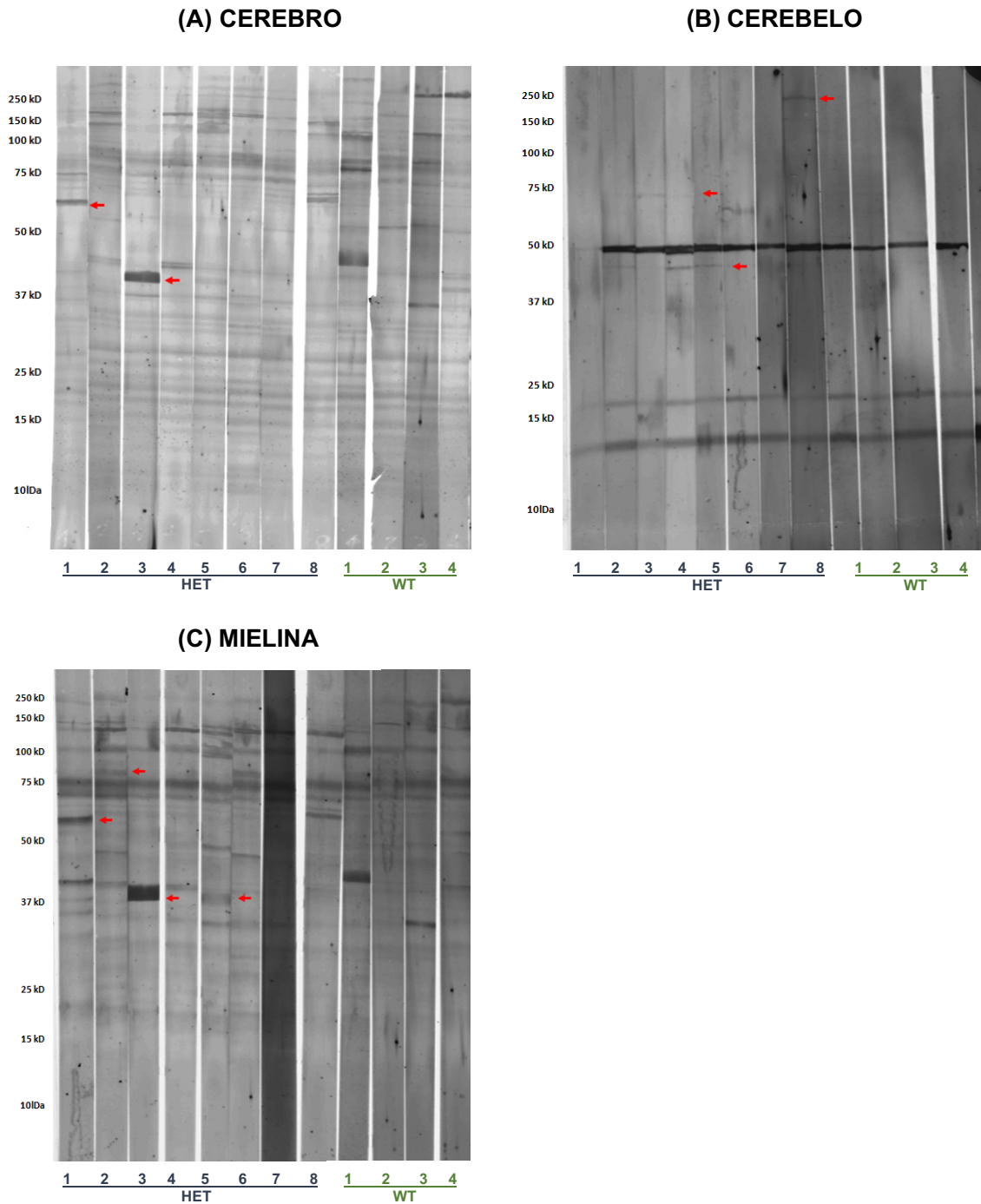
Los primeros anticuerpos que se producen en una respuesta mediada por anticuerpos son siempre IgM, los cuales tienden a ser de baja afinidad. Sin embargo, moléculas IgM forman pentámeros lo que les permite unirse simultáneamente a antígenos multivalentes como polisacáridos capsulares bacterianos<sup>209</sup>. Esto compensa la afinidad relativamente baja de los monómeros IgM. Como resultado del gran tamaño de los pentámeros, IgM se encuentran principalmente en sangre. Por otro lado, IgG es el principal isotipo en sangre y opera de manera eficiente principalmente a nivel de tejidos opsonizando patógenos y activando el sistema del complemento. Se ha evidenciado que respuestas mediadas por anticuerpos es acelerada en ausencia de IgM secretada, indicando que presencia de autoanticuerpo IgG pueden potencialmente resultar patogénicos, mientras que IgM resultan protectores<sup>209</sup>.

Al analizar la presencia de bandas diferenciales entre animales MUT para MeCP2 con respecto a los WT, no se encontró un patrón diferencial y persistente para ninguno de los animales analizados. Sólo en alguno de ellos se identificaron bandas únicas que no se encontraron en otros representantes del grupo MUT ni de los WT. La identificación de autoanticuerpos diferenciales en MUT (marcados en rojo en la imagen de los Western Blot) no exhiben un patrón en común entre todos los animales analizados, sino más bien, resultaría dependiente del individuo mostrando gran variabilidad en la presencia de los mismos (**Figura 33**). El mismo procedimiento se realizó utilizando sueros de hembras heterocigotas y arrojó un resultado similar (**Figura 34**).

**Estos resultados sugieren que la deficiencia de MeCP2 no induciría la presencia de autoanticuerpos séricos contra componente de SNC, al menos en las condiciones estudiadas.**



**Figura 33. Inmunorreactividad humoral en suero de animales WT y MUT para MeCP2.** Las tiras de nitrocelulosa conteniendo distintas fracciones de SNC fueron incubadas con suero de animales WT o MUT diluidos 1:50 o con anticuerpos específicos contra Sinaptofisina (1:500) y revelados con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Inmunorreactividad contra proteínas de (A) cerebro de ratones de 4 semanas de edad (pre-sintomáticos) y de 7 semanas de edad (A') y de (B) cerebelo de ratones de 4 semanas de edad y 7 semanas de edad (B').



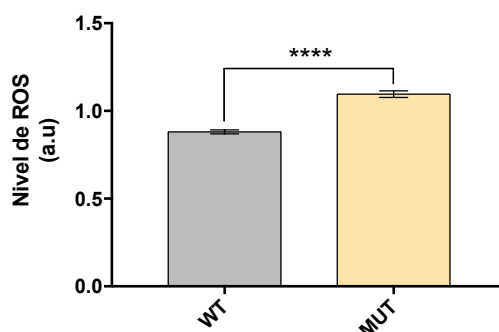
**Figura 34. Inmunorreactividad humoral en suero de hembras heterocigotas para la mutación para MeCP2.** Las tiras de nitrocelulosa conteniendo distintas fracciones de SNC fueron incubadas con suero de animales WT o MUT diluidos 1:50, revelados con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Inmunoreactividad contra proteínas de cerebro (A) cerebelo (B) y (C) mielina de ratones hembras heterocigotas. Las flechas rojas señalan la presencia de bandas presentes en hembras heterocigotas (HET) y que no se reproduce en WT.

### MeCP2 influncia el balance redox en animales MUT.

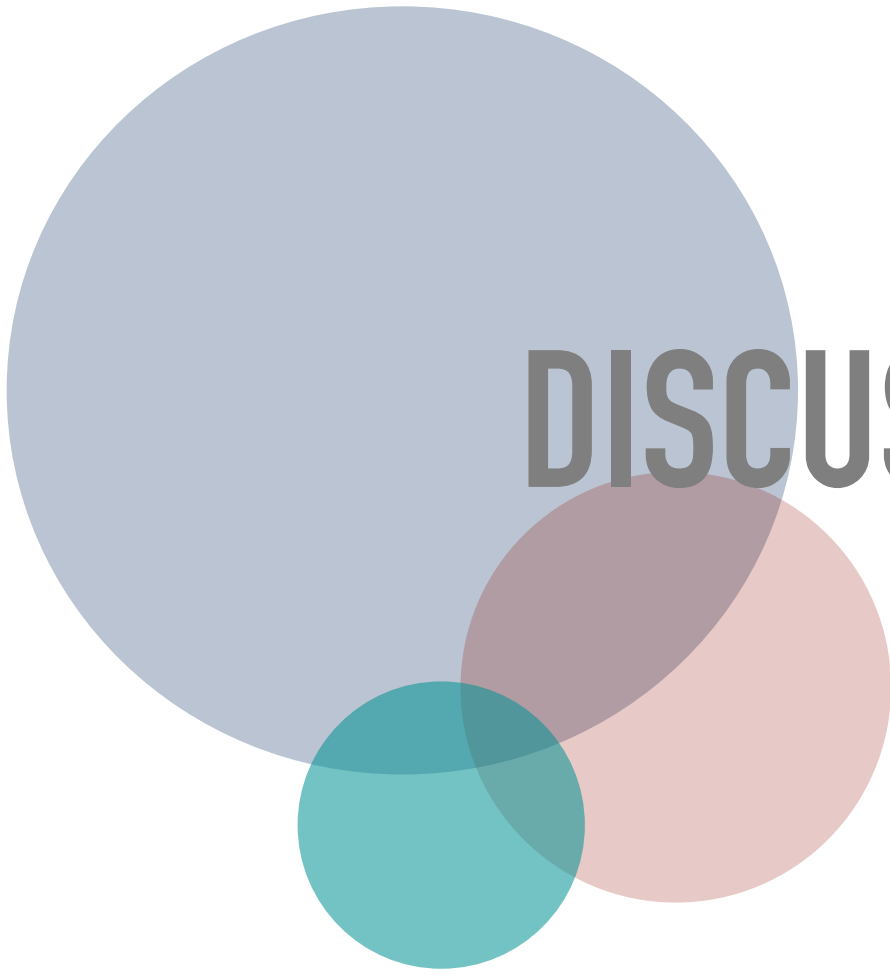
En animales MeCP2-*null* y en pacientes con RTT se ha evidenciado la presencia de un estrés oxidativo crónico. En el modelo MeCP2-MUT se ha visto un aumento de Isoprostanos, marcadores de estrés oxidativo, desde la etapa pre-sintomática en plasma<sup>210-212</sup>. Para establecer si en ratones MUT, en cuyos MDMO se observaron mayores niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, también presentan mayores niveles de ROS sistémico, se realizó un análisis de los niveles de ROS en sangre obtenida de ratones sintomáticos (12 semanas post-natales) a través de espectroscopía paramagnética electrónica (EPR).

Se realizaron tres experimentos independientes y se analizaron los niveles de ROS normalizando los distintos valores obtenidos en cada experimento independiente. En todos los casos, animales MUT mostraron niveles significativamente mayores de ROS respecto a los WT (**Figura 35**).

**Este resultado sugiere que MeCP2 altera el desbalance redox en condiciones basales, es decir, en ausencia de un estímulo inflamatorio u oxidativo en animales MUT.**



**Figura 35. Nivel de especies reactivas del oxígeno en sangre total de animales MUT y WT para MeCP2.** Animales de 12 semanas de edad- post sintomáticos- fueron sacrificados y se obtuvo la sangre total. A través de EPR se determinó el nivel de ROS. Valores obtenidos en tres experimentos independientes se normalizaron para obtener el nivel de ROS. Datos se presentan como media  $\pm$  SEM en unidad arbitraria. Test t Student. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . N por grupo experimental: 8-10.



# DISCUSIÓN

## ESTUDIOS *IN-VITRO*

### ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES DEFICIENTES PARA MECP2

Los macrófagos son células básicas de la inmunidad innata y adaptativa que se encuentran virtualmente en todos los tejidos. La fuente principal de los macrófagos son monocitos de la médula ósea que migran a varios tejidos, se adhieren y maduran a macrófagos. En varias enfermedades y desórdenes humanos, éstas células detectan infecciones en tejidos, procesos de daño o condiciones desfavorables como hipoxia o estrés metabólico. Al demostrar tener una gran plasticidad en respuesta al ambiente, los macrófagos son reguladores esenciales en múltiples procesos biológicos como la inmunidad innata, adaptativa, angiogénesis, reproducción e inclusive, procesos malignos<sup>213</sup>.

Se ha propuesto que disfunciones en células mieloides como macrófagos y microglia, contribuirían activamente a la patogénesis de RTT. En pacientes con RTT, citoquinas relacionadas a macrófagos se encuentran niveles anormales en circulación, como  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-10 y  $TGF-\beta 1$ <sup>149</sup>. De hecho, la desregulación de citoquinas observada se ha relacionado directamente con la severidad clínica, el estatus inflamatorio y el estado redox<sup>142</sup>. Hasta el momento, todos los estudios realizados con el fin de determinar la función de MeCP2 en células mieloides han utilizado modelos KO o *null* de ratón que muestran ausencia total de proteína, ó líneas celulares WT en las cuales se silenció la expresión de MeCP2. Además, estos trabajos se concentraron principalmente en el estudio de células microgliales debido a su estrecha interacción con neuronas. Si bien las células microgliales y los macrófagos residentes de tejidos comparten un origen embrionario en común<sup>183</sup>, se evidenció que MeCP2 actúa de manera célula-dependiente en poblaciones de células mieloides<sup>165</sup>. Por esta razón, en esta primera parte de la tesis decidimos evaluar si mutaciones en MeCP2 alteran respuestas inmunes típicas y, si lo hacen, comparar con lo observado en modelos que presentan ausencia total de MeCP2. Para ello utilizamos el modelo de macrófagos diferenciados a partir de médula ósea (MDMO).

El modelo de MDMO es ampliamente utilizado para estudiar los distintos fenotipos de macrófagos *in-vitro*. Para la diferenciación de precursores de médula ósea, éstos se exponen a M-CSF y/o GM-CSF<sup>189</sup>. Se determinó que monocitos MeCP2-*null* Ly6c<sup>high</sup> muestran una cinética de diferenciación a macrófagos y capacidad proliferativa similar que los WT<sup>165</sup>. De manera similar, en esta tesis se pudo determinar que no existen defectos en precursores de médula ósea provenientes de ratones MUT para diferenciarse a macrófagos. En este sentido, la diferenciación de éstas células inmunes parece similar a lo observado en neuronas, ya que la ausencia de MeCP2 no altera la diferenciación de precursores neuronales sino más bien, afecta procesos en estadios más tardíos como el mantenimiento neuronal, el refinamiento, el *pruning* o poda sináptica, el guiado axonal, la plasticidad sináptica, entre otros<sup>63,68,214,215</sup>. Es importante mencionar que tales defectos evidenciados en neuronas son mantenidos por células mieloides<sup>64,216</sup>. Así, la primera noción de que la falta de MeCP2 en microglia mantiene el fenotipo patológico en neuronas se demostró en un estudio en que células microgliales MeCP2-*null* producían niveles neurotóxicos de glutamato<sup>64</sup>. Por otro lado, un estudio longitudinal en ratones MeCP2-*null*, orientado a caracterizar la microglia y poblaciones de macrófagos periféricos, muestra una disminución del tamaño de esas poblaciones a lo largo del curso patológico, acompañado de niveles alterados de genes relacionados a respuestas a hipoxia y glucocorticoides<sup>165,217</sup>.

La activación de macrófagos con LPS+IFN $\gamma$  conduce a la producción de grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, moléculas presentadoras de antígenos y de óxido nítrico. Para caracterizar el perfil M1, macrófagos activados por vía clásica, evaluamos los niveles de expresión citoquinas prototípicas de este perfil. Pudimos determinar que MDMO-MUT expresaron mayores niveles del transcripto que codifica a TNF $\alpha$  lo cual se asemeja a lo encontrado en múltiples estudios en modelos MeCP2-*null* y en pacientes RTT<sup>142,165,214,218</sup>. Se demostró que suprimiendo la expresión de MeCP2 en células mononucleares de sangre periférica en humanos (PBMC) y en la línea celular de monocitos humanos TH1, la expresión de los ARNm codificantes para IL-6, IL-3 y TNF $\alpha$  es diferencialmente aumentada en respuesta a LPS<sup>218</sup>. Asimismo, Derecki y col. analizaron la respuesta de macrófagos peritoneales de ratones MeCP2-*null* inyectados con TNF $\alpha$  o salina. El análisis mostró que en ratones MeCP2-*null* inyectados con salina (es decir, sin estímulo), los niveles de citoquinas y quimioquinas (como IL-6, IL-3, CXCL3, CXCL1, CXCL2, entre otros) que sí son inducidas por TNF $\alpha$ , no se hallaban alterados<sup>165</sup>. Tal como se demostró en esta tesis, para ningún gen analizado (TNF $\alpha$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6. **Figura 15**) se observaron diferencias de expresión entre WT y MUT en condiciones basales, indicando que la activación inmune sería necesaria para que MeCP2 module respuestas pro-inflamatorias. En cuanto a la citoquina IL-6, a pesar que en líneas



celulares de adenocarcinoma pancreático *MeCP2-null* se demostró que MeCP2 está involucrado en la represión transcripcional de IL-6<sup>219</sup>, nuestros resultados no evidenciaron que la mutación en MeCP2 lleve a cambios en la expresión de la citoquina IL-6 ni en el modelo *in-vitro* utilizado o en condiciones *in-vivo* (parte II). Esto indicaría que la deficiencia versus la ausencia total de MeCP2 podrían conducir a una regulación génica diferencial sobre IL-6.

Además de liberar mayores niveles de glutamato, las células microgliales *MeCP2-null*, han mostrado niveles de expresión aumentados de NF-κB en respuesta a LPS<sup>220</sup>. Otros estudios realizados en el mismo modelo sugieren que MeCP2 actúa como un regulador maestro en la represión transcripcional de las respuestas inflamatorias en macrófagos y microglia<sup>190,221</sup>. Un mecanismo efector clave en los macrófagos M1 es la producción de ON mediado por la enzima iNOS, el cual tiene una actividad antimicrobiana directa. Los inductores transcripcionales prototípicos de iNOS incluyen a los TLR e IFN $\gamma$  mediante la activación de la vía NF-κB y JAK/STAT respectivamente<sup>98</sup>. A pesar de que la vía NF-κB parece estar directamente regulada por MeCP2, y que la activación de macrófagos vía citoquinas o ROS convergen en la misma para producir ON, no encontramos diferencias en la producción de ON entre MDMO-WT y MDMO-MUT. Tampoco observamos diferencias en el nivel de expresión de iNOS 4 horas posteriores a la estimulación con LPS+IFN $\gamma$ . La interpretación de este resultado es compleja ya que todo indicaría que la influencia de MeCP2 en la expresión de enzimas de la vía de producción del óxido nítrico es altamente dependiente de la estimulación y del contexto (*in-vivo* vs. *in-vitro*). Por ejemplo, en neuronas del sistema nervioso entérico de ratones *MeCP2-null*, se ha visto un aumento en la expresión de nNOS (óxido nítrico sintetasa neuronal) bajo estimulación constante por hipercalemia (exceso de KCl)<sup>222</sup>. Sin embargo, en este mismo trabajo, no se pudo observar esta diferencia en neuronas *in-vitro* sino, por lo contrario, determinó una disminución con respecto a neuronas entéricas WT, reafirmando que el ambiente en el que se encuentran las células, influencia de manera activa su función intrínseca y respuestas a cambios ambientales.

Múltiples vías de señalización y estímulos celulares participan en la fisiología del macrófago. La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> conforma parte de esta respuesta M1 y es generado por sistemas biológicos por la reducción univalente del oxígeno molecular<sup>100</sup>. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) participan en varios procesos vitales como la traducción de proteínas, interacciones proteicas, expresión génica y modificaciones post-traduccionales. Sin embargo, la producción excesiva de ROS o la desintoxicación insuficiente por enzimas antioxidantes interrumpen el balance redox y generan un estado de estrés oxidativo<sup>99</sup>. En nuestro trabajo pudimos determinar que, independientemente de la estimulación con LPS y con IFN $\gamma$ , MDMO-MUT mostraron mayores niveles de superóxido intracelular, indicando un

desbalance redox, tal como se ha reportado en pacientes y en modelos MeCP2-*null*<sup>160,210,211,223</sup> (**Figura 18**). Sumado a este resultado, pudimos determinar en sangre total de animales sintomáticos de 12 semanas de edad que los niveles de ROS fueron significativamente mayores en ratones MUT (**Anexo**). Por lo tanto, la respuesta de macrófagos podría contribuir activamente al desbalance en la producción y regulación de ROS sistémico observado. Este punto es importante a tener en cuenta ya que las ROS, además de ser un producto metabólico, son inductores de respuestas inflamatorias o M1. En pacientes con RTT, se reportó que la actividad de enzimas necesarias para mantener el balance redox, como por ejemplo, la superóxido dismutasa, se halla disminuida y esto se vio acompañado de mayor peroxidación de lípidos<sup>195</sup>. Las implicancias de estos antecedentes y de nuestros resultados es que, ante mutaciones en MeCP2, el perfil inflamatorio exacerbado podría mantenerse por un mecanismo que se autoalimenta basado en la inducción generada por el desbalance oxidativo y potencialmente, los macrófagos podrían actuar directamente afectando la homeostasis tisular *in-vivo*.

Un estudio del perfil global de expresión génica en macrófagos peritoneales y microglia aislada de ratones MeCP2-*null*, mostró un aumento de genes relacionados con la respuesta a glucocorticoides (GC), indicando que MeCP2 actuaría como un represor de esta vía<sup>165</sup>. Los glucocorticoides son esenciales para mediar respuestas al estrés y en este sentido, macrófagos estimulados con corticosterona *in-vitro* muestran respuestas inmunoregulatorias. Existen diferencias marcadas en la respuesta de macrófagos M2 estimulados con IL-4 (M-IL4) y con GC (M-GC); por ejemplo, macrófagos M(IL-4) secretan altas cantidades de componentes de la matriz extracelular, mientras que en macrófagos M(GC) no se detectan o se producen bajos niveles. Por lo tanto, la inactivación de la vía de macrófagos activados por GC, evitaría la formación normal de cicatriz por colágeno, la neovascularización y, en consecuencia, se estimularía la diferenciación de macrófagos M1<sup>224</sup>. Sin embargo, no queda claro cómo tales genes alterados en respuesta a GC en conjunto participarían en mediar respuestas inmunoregulatorias, más aún por la presencia de respuestas inflamatorias exacerbadas en el contexto MeCP2-*null*. A pesar de estos antecedentes, ningún estudio hasta el momento se ha enfocado en caracterizar respuestas anti-inflamatorias en poblaciones de células mieloides mutantes para MeCP2. Dada la importancia de las respuestas tipo M2 en el mantenimiento de la homeostasis inmune, evaluamos si en presencia de IL-4, MDMO-MUT podían responder adecuadamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que MeCP2 es un importante regulador de respuestas anti-inflamatorias, ya que MDMO-MUT activados con IL-4 mostraron una respuesta M2 deficiente. Esto fue evidenciado por los menores niveles de expresión de

FIZZ1 y la falla en aumentar la expresión de genes como IL-10 y CD206 en condiciones polarizantes.

La estimulación de IL-4 en macrófagos induce la expresión de miR-124 y media la expresión de CD206. Los micro-RNA o miR son secuencias cortas de ARN que no codifican a proteínas y que regulan la transcripción, la estabilidad del ARNm y la traducción. Además son críticos para la expresión y el control epigenético de al menos la mitad de todos los genes conocidos<sup>225</sup>. En macrófagos, miR-124 es esencial para la inducción y el mantenimiento del fenotipo M2 ya que al inhibir la expresión de miR-124 se suspende el aumento de la expresión de CD206 y la disminución de la expresión de marcadores M1 (como CD86 y TNF $\alpha$ ) en condiciones M2-polarizantes<sup>226</sup>. Sin embargo, el rol de miR-124 es dependiente del tipo celular<sup>226</sup>. En células T CD4<sup>+</sup>, miR-124 es regulado *in-vitro* e *in-vivo* por MeCP2, la cual es necesaria para la correcta diferenciación a células Th1 y Th17<sup>153</sup>. La pérdida de MeCP2 en células T CD4<sup>+</sup> resulta en una disminución en la expresión de miR-124 y, en consecuencia, se inhibe la activación de STAT1 y STAT3 impidiendo la diferenciación en células Th1 y Th17 respectivamente, es decir conduciendo a un perfil inmunosupresor. Estos datos indican que la posible regulación dada por MeCP2 sobre vías de señalización necesarias para mantener el perfil M2 en macrófagos *in-vitro* es compleja, y se deben conducir experimentos destinados a entender los posibles actores involucrados en cada tipo celular.

En esta tesis hallamos menor expresión de FIZZ1, también conocido como RELM $\alpha$  (molécula tipo resistina  $\alpha$ ), la cual es una proteína secretada rica en cisteína<sup>194</sup>. FIZZ1 aumenta su expresión bajo infección por helmintos, IL-4 e IL-13 y es suprimida en presencia de IFN $\gamma$ <sup>227</sup>. FIZZ1 es un factor recientemente descrito como marcador M2 y ha sido principalmente estudiado en pulmón ya que participa en la diferenciación de miofibroblastos que median la fibrosis pulmonar. FIZZ1 se induce bajo inflamación alérgica de pulmón donde estimula la expresión de  $\alpha$ -SMA (*smooth muscle actin* o actina de músculo liso) y de colágeno en fibroblastos de pulmón<sup>228</sup>. A su vez,  $\alpha$ -SMA es regulado de manera indirecta por MeCP2 y ratones MeCP2-*null* muestran menor fibrosis pulmonar<sup>229</sup>. Al ser un factor que ha sido descrito recientemente, nada se sabe sobre el rol de FIZZ1 en el contexto de mutaciones o pérdida total de MeCP2. Por lo tanto, sería interesante y de gran importancia poder comprender la interacción con FIZZ-1 en este contexto por las posibles implicancias terapéuticas en pacientes con RTT, debido a las recurrentes afecciones pulmonares que presentan<sup>230</sup>.

Durante la activación por vía alternativa en macrófagos peritoneales y de bazo, se observó que IL-10 aumenta significativamente acompañado de mayores niveles de ARG-1 y citoquinas anti-inflamatorias e inmunoreguladoras<sup>194</sup>. Poco se sabe sobre respuestas mediadas

por la citoquina IL-10 que involucren la regulación por MeCP2. En astrocitos, MeCP2 participaría en la regulación de respuestas anti-inflamatorias al ser blanco de miR-181 cuya acción es reprimir la expresión de MeCP2; y cuando miR-181 se sobre-expresa, se produce un aumento en la producción de IL-10<sup>231</sup>. Por otro lado, en células musculares esqueléticas de animales MeCP2-*null*, se determinó que la expresión de IL-10 no sería directamente regulada por la falta de MeCP2, sino más bien, generando alteraciones en la cinética de respuesta mediada por esta citoquina luego de una injuria muscular<sup>232</sup>. De esta manera, podemos hipotetizar que en macrófagos MeCP2 podría actuar de manera indirecta regulando la expresión de IL-10. Sin embargo, considerando los pocos antecedentes al respecto, se deberá conducir un análisis exhaustivo para identificar cuáles vías de señalización y factores de transcripción que median la expresión de IL-10, se ven afectadas por mutaciones en MeCP2. Por último, en este trabajo encontramos que la respuesta M2 mediada por ARG-1 no es influenciada por MeCP2 ya que no encontramos diferencias significativas en la expresión de ARG-1 en MDMO-MUT vs WT. Todo indicaría que MeCP2 en macrófagos parece tener poca influencia en la expresión de enzimas de la vía metabólica de la arginasa al menos en condiciones *in-vitro*.

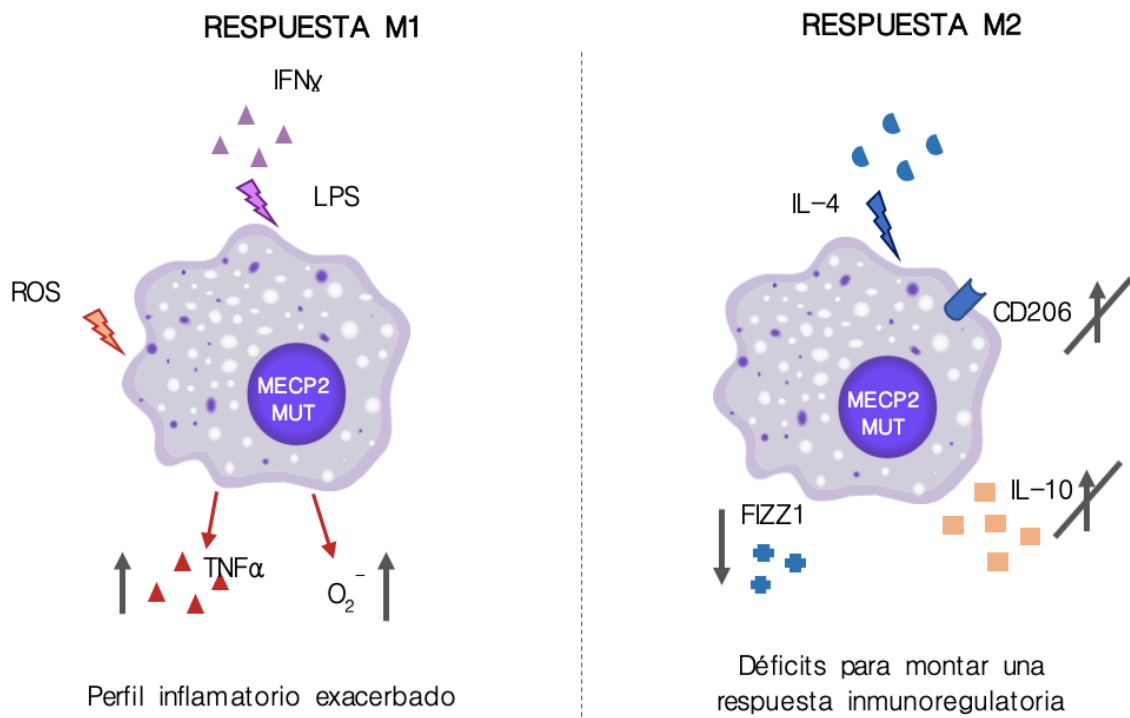
Cabe tener en cuenta que los análisis de expresión en macrófagos M1 y M2 son específicos para cada tejido y a su vez, comparten genes en común. Cuando macrófagos se transfieren de un tejido a un ambiente *in-vitro* sus transcriptomas cambian y por lo tanto, se sugiere que existe un transcriptoma específico para macrófagos *in-vitro*<sup>189</sup>. Sin embargo, resulta altamente valioso como primer paso para la interpretación del potencial comportamiento *in-vivo* y durante un estímulo inmune. El paradigma M1/M2 representa una situación extrema *in-vitro* del entorno *in-vivo*, en el cual existe un “continuo” de estados de activación. Además, tanto macrófagos M1 como M2 pueden sufrir cambios funcionales reversibles dependiendo del ambiente. Este “continuo” juega un rol dinámico crítico durante la inflamación y su resolución. Ésta puede tomar desde minutos a días o, en casos de daño severo, meses o años, llevando a una inflamación crónica no controlada, que se presenta en patologías como enfermedades autoinmunes o cáncer.

Considerando nuestros resultados y los reportados previamente por otros autores, podemos reafirmar que MeCP2 es un importante regulador de la función de macrófagos al mediar respuestas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias e inmunoregulatorias, afectando el balance M1/M2 *in-vitro*. Dada algunas discrepancias en niveles de expresión de ciertos genes analizados en este trabajo con respecto a lo reportado<sup>142,218,219,233,234</sup>, no cabe duda que, por un lado, la ausencia total de MeCP2 vs. su presencia como proteína trunca, puede generar alteraciones diferenciales en macrófagos/microglia. Por el otro, podemos reafirmar que

MeCP2 es dependiente de cada tipo celular, del tipo de estímulo que lleva a su activación y del ambiente en el que se encuentre (*in-vivo o in-vitro*). En conjunto, dado que MeCP2 regula vías de respuesta en macrófagos, es necesario indagar aún más para determinar las consecuencias en el contexto de una enfermedad que afecte todo el organismo, como en RTT. Aunque esta tarea es extremadamente difícil de predecir, especialmente considerando la gran variedad de los fenotipos de macrófagos en tejidos y sangre, una mejor interpretación de la función de MeCP2 es esencial para plantear posibles intervenciones terapéuticas en humanos en desórdenes relacionados con MeCP2.

# RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS

**MeCP2 CUMPLE UN ROL ESENCIAL PARA LA CORRECTA RESPUESTA EN MACRÓFAGOS  
BAJO CONDICIONES POLARIZANTES PRO- Y ANTI-INFLAMATORIAS.**



## PARTE II:

# ESTUDIOS *IN-VIVO*

### EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE RESPUESTAS INFLAMATORIAS EN RATONES MUTANTES PARA MECP2 FRENTE A UN DESAFÍO AUTOINMUNE

Mutaciones en el gen que codifica a MeCP2 son la causa más frecuente de los casos clínicos de RTT. Sin embargo, dichas mutaciones o la expresión alterada de este gen están asociadas asimismo con un espectro de desórdenes del neurodesarrollo y autismo. Por esta razón, desde el descubrimiento de la etiología genética de RTT, numerosos estudios han concentrado sus esfuerzos en comprender cómo la pérdida de función de MeCP2 lleva a distintas alteraciones a nivel neuronal y de circuitos en el cerebro. En la actualidad está ampliamente aceptado que existe una interacción continua entre el sistema inmune y el sistema nervioso, la cual debe estar en homeostasis constante ya que alteraciones en uno u otro sistema, llevan a patologías asociadas y comorbilidad en desórdenes del neurodesarrollo. La mayor parte de la información disponible sobre alteraciones a nivel del sistema inmunológico, se han llevado a cabo en modelos animales que no expresan MeCP2. Por lo tanto, desde un punto de vista potencialmente traslacional y representativo de la fisiopatología en RTT y desórdenes asociados, aún queda por ser esclarecido. Sólo un trabajo evaluó el estado inflamatorio en ratones hembras MeCP2<sup>308/y</sup> a través del uso de la proteómica. En el mismo se determinó que proteínas APR (proteínas de respuestas en fase aguda) y proteínas de unión tipo CD5 y vitamina D (proteínas relacionadas a la inflamación) se vieron aumentadas, indicando la presencia de un estado inflamatorio sin resolver en este modelo<sup>147</sup>. Por lo tanto, dada la poca información acerca del potencial efecto de mutaciones en MeCP2 en la función inmune y la importancia en la homeostasis neuroinmune en la patología de RTT, nuestro segundo objetivo fue el de evaluar la respuesta inmune en el contexto de un desafío autoinmune (usamos el modelo de la EAE) en el modelo MeCP2<sup>308/y</sup>.

Durante la EAE en ratones, posterior a la inmunización con antígenos de mielina en adyuvante completo de Freund y la toxina *Pertussis*, las células dendríticas captan y procesan el antígeno de mielina MOG inyectado y viajan a los órganos linfáticos secundarios (ganglios y bazo)<sup>176</sup>. Las células dendríticas son activadas por componentes de *Mycobacterium tuberculosis* que forma parte de adyuvante, a través de receptores tipo Toll (TLR) y presentan

el antígeno de mielina a células T vírgenes<sup>177</sup>. Las células T activadas específicas para MOG se diferencian a células Th1 y Th17 que proliferan, producen citoquinas como IFN $\gamma$  e IL-17 respectivamente, y expresan moléculas de adhesión como la integrina de superficie  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) y el antígeno funcional de leucocitos (LFA-1)<sup>235</sup>. Posteriormente pasan al torrente sanguíneo y entran al SNC ya que la barrera hematoencefálica perdió su permeabilidad selectiva debido a la toxina *Pertussis*<sup>177</sup>. Las células inmunes en el SNC se encuentran con antígenos de mielina y son reactivadas localmente por células presentadoras de antígenos. De esta manera, se produce la expansión clonal de células T y la liberación de mediadores inflamatorios que ayudan a reclutar otras células inmunes al sitio de inflamación<sup>176</sup>. La activación de células microgliales y de células infiltrantes resulta en la producción de proteasas, glutamato, formas reactivas del oxígeno y otros agentes citotóxicos que promueven la destrucción de la mielina. El daño en la vaina de mielina es seguido por daño axonal y déficits neurológicos. Estudios recientes evidenciaron que durante la progresión de la EAE, la isoforma MeCP2-e1 aumenta su expresión y participa reprimiendo la expresión de BDNF en médula espinal<sup>236,237</sup>. Niveles subóptimos de esta neurotrofina provocan daños de la mielina y el retraso de la remielinización<sup>236</sup>. En nuestro trabajo pudimos determinar que MeCP2 sería necesaria durante el inicio y la progresión de la EAE, indicando que es una proteína con un rol activo en respuestas autoinmunes.

Primero, se evaluó el desarrollo clínico en ratones MUT luego de ser inmunizados con MOG, y se observó un adelanto en la aparición de los primeros signos clínicos respecto a los ratones WT. El adelanto en la aparición de signos clínicos fue acompañado por un aumento en la presencia de infiltrados en médula durante la etapa aguda, 12 días post inducción. En conjunto, estos resultados sugieren que mutaciones en MeCP2 generan en ratones una mayor susceptibilidad para el desarrollo de la EAE. Como en ningún ratón MUT-CFA se hallaron evidencias de infiltrados celulares en médula, la mayor prevalencia de focos de infiltrados en MUT-EAE probablemente no se debe a alteraciones de permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En este sentido, en pacientes con RTT se observó un aumento de CD6, una molécula co-estimuladora cuyo ligando es ALCAM (molécula de adhesión activada de leucocito) y participa en la migración de leucocitos a través de la BHE. Aunque el desarrollo precoz de la EAE y el aumento de infiltrados en médula podría guardar alguna relación con alteraciones en la integridad de la BHE, este punto aún queda por dilucidarse. Al evaluar el perfil autorreactivo de células mononucleares de bazo *in-vitro* al re-estimularlas con MOG, las CMN aisladas de ratones MUT-EAE respondieron produciendo mayores niveles de IL-2, la cual es una citoquina inductora del proceso de expansión clonal de células T durante la EAE<sup>238,239</sup>. Como resultado de una retroalimentación positiva autócrina mediada por IL-2, se



impulsa el crecimiento y la proliferación de células específicas para antígeno<sup>240,241</sup>. Por lo tanto, se podría hipotetizar que existiría una posible relación entre la presencia de mayores focos de células inmunes infiltrantes en médula con la capacidad proliferativa específica para MOG de CMN en órganos linfáticos en animales MUT.

Curiosamente, durante la etapa aguda, también se observó que CMN aisladas de bazo de ratones MUT-EAE y estimuladas con MOG, produjeron mayores niveles de IL-4 respecto a los WT. Esta citoquina actúa a través del receptor de IL-4 (IL-4R) el cual se expresa principalmente en macrófagos perivasculares y por ende, esta citoquina es potencialmente un regulador del compartimiento mieloide en animales con EAE<sup>242</sup>. Se ha visto que la inactivación del gen IL-4 en ratones EAE lleva a signos clínicos más severos, acompañado de mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias en médula espinal<sup>243</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que esta citoquina actúa como una importante molécula inmunoreguladora durante la EAE en el SNC y no a nivel periférico<sup>244</sup>. Además, el análisis de los radios Th2/Th1 (evaluados entre IL4/IFN $\gamma$  e IL4/TNF $\alpha$ ) para MUT no mostraron diferencias significativas con respecto a los WT. En este aspecto, se pudo determinar que la menor producción de IL-10 por CMN-MUT fue la que más impactó en el balance de citoquinas Th2/Th1; independiente de la estimulación con MOG, las CMN-MUT no respondieron aumentando la expresión de IL-10.

La evaluación de la respuesta específica para MOG de CMN obtenidas de bazo de animales EAE durante la etapa aguda, no arrojó diferencias en la producción de otras citoquinas entre WT y MUT. Se ha visto que en la inducción de la EAE las citoquinas IL-6 e IL-17 son claves ya que ratones deficientes para IL-6, para IL-17 o el bloqueo del receptor de IL-6, mostraron ser resistentes a desarrollar la EAE<sup>123,245,246</sup>. Por otro lado, poco se ha estudiado sobre la influencia de MeCP2 en la expresión de IL-6 y de IL-17. Los resultados obtenidos hasta el momento, indicarían que MeCP2 actúa como un represor transcripcional sobre IL-6<sup>218,247</sup>. Aunque el mecanismo se desconoce, se sabe esta regulación no depende de su unión al promotor. También se evidenció que MeCP2 afecta la correcta diferenciación de células Th17 y subsecuente producción de IL-17 en células CD4+ en condiciones polarizantes, pero MeCP2 no interviene en cambios en la accesibilidad del gen de IL-17<sup>153</sup>. Se sugiere que la deficiencia de MeCP2 no afectaría directamente en el control de la expresión de estas citoquinas, tal como se observa en ausencia total de MeCP2 y bajo otros sistemas de estimulación *in-vivo*. Otros mecanismos estarían actuando para el adelanto del inicio de la EAE y la mayor severidad observada en MUT. Por ejemplo, en este trabajo se evidenció que, la producción de TNF $\alpha$  en respuesta a MOG en CMN de ratones MUT-EAE, no disminuyó desde la etapa aguda a la crónica (**Figura 29**). Este punto es importante de señalar ya que la remisión parcial hacia la etapa crónica se caracteriza por la disminución de los niveles de

producción de TNF $\alpha$ , es decir, de la autorreactividad específica para MOG que caracteriza la etapa aguda<sup>196</sup>. Tal regulación en ratones MUT-EAE fue deficiente, ya que CMN re estimuladas produjeron mayores niveles no sólo de TNF $\alpha$  sino también de IFN $\gamma$ . Sumado a esto, para esta última citoquina, se observó mayor producción con respecto a las WT. Esta falta de regulación de la autorreactividad se ha visto en ratones deficientes para IL-10<sup>248</sup>, indicando que MeCP2 podría regular directamente genes como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  o IL-10, y a su vez, a falta de una regulación recíproca entre estos mediadores, podría exacerbar la patogénesis de la EAE.

Antecedentes en la literatura indican que las células gliales, en particular la microglia, poseen un rol protagónico en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Por ende, numerosos estudios se han concentrado en estas células con el objetivo de comprender la función de MeCP2 en las interacciones neuroinmunes. En ratones MeCP2-*null*, se observaron que las células microgliales son relativamente pequeñas, pero al responder a un estímulo ambiental toman una morfología más grande que en los WT. La falta total de MeCP2 se ha relacionado con la regulación de estados de activación de la microglia<sup>221</sup> al disminuir la capacidad fagocítica de las mismas<sup>42</sup>. Teniendo en cuenta la importancia de las células microgliales en RTT, en esta tesis, se comparó el nivel microgliosis entre ratones MUT-EAE y WT-EAE. Al igual que lo observado al analizar la expresión génica de Iba-1, no se encontraron diferencias significativas dependientes de los genotipos durante la etapa aguda y crónica en el área Iba-1+. Este resultado indica que MeCP2 no es necesaria para la normal expresión de Iba-1, pero como se expuso antes, sí sería importante para su normal funcionamiento.

Proseguimos a analizar el nivel de expresión de TSPO o también llamado PBR (receptor periférico de benzodiazepinas), la cual es una proteína transmembrana localizada en la membrana externa mitocondrial presente principalmente en células gliales<sup>198</sup>, y también en linfocitos y monocitos<sup>249,250</sup>. El hecho que la expresión de TSPO aumente en muchas enfermedades del SNC, como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis múltiple, demencia, entre otras, se considera un marcador de activación de células mieloides en el sistema nervioso<sup>251</sup>. Se cree que el aumento de la expresión de TSPO tiene un efecto protector durante la EAE, y que podría ser un mecanismo de respuesta adaptativa o de compensación ante el daño<sup>198,205</sup>. En pacientes con RTT se ha encontrado al gen que codifica TSPO *up*-regulado, lo cual se asocia a otros genes desbalanceados relacionados a posibles mitocondriopatías<sup>148</sup>. Sin embargo, en este trabajo no encontramos diferencias significativas en el nivel del transcripto de TSPO entre genotipos, ya que sus niveles aumentan de manera similar en animales WT y MUT-EAE, indicando que la posible respuesta adaptativa y protectora se daría en igual medida en ratones WT y MUT.

Dado que el perfil inflamatorio proporcionado por las citoquinas determina el fenotipo resistente o encefalitogénico durante la EAE, quisimos evaluar cómo distintas citoquinas y marcadores inmunes son influenciados por MeCP2 durante la EAE crónica, etapa en la cual evidenciamos mayor desregulación periférica y retraso en la recuperación motora. Entre las citoquinas que analizamos se halla la IL-1 $\beta$ , la cual es producida de manera dependiente o independiente de la activación del inflamasoma<sup>252</sup>. Durante la EAE, la fuente principal de producción son neutrófilos y macrófagos derivados de monocitos que liberan IL-1 $\beta$  como resultado de la transmigración a través de la BHE<sup>253</sup>. En particular, IL-1 $\beta$  es un mediador crítico de la EAE ya que ratones deficientes de IL-1 $\beta$ , NLRP3 o caspasa 1, son más resistentes a desarrollar EAE<sup>254</sup>. Además, IL-1 $\beta$  activa células microgliales que estimula células T autorreactivas al actuar como células presentadoras de antígenos<sup>255</sup>. En este trabajo observamos que médulas de ratones MUT expresaron mayores niveles del ARNm de IL-1 $\beta$  respecto a los WT. Poco se ha investigado sobre el rol de esta citoquina en desórdenes ligados a mutaciones en MeCP2 y recientemente mostró el rol del inflamasoma y de sus productos (IL-1 $\beta$  e IL-18) en RTT. Pecorelli y colaboradores, obtuvieron fibroblastos de pacientes con RTT, los expusieron a LPS + ATP (un activador típico para el inflamasoma NLRP3) y observaron que los mismos fueron incapaces de responder al estímulo. Además, bajo condiciones basales, los fibroblastos RTT muestran un estado pre-activado de la maquinaria del inflamasoma como de pre-IL $\beta$ / IL $\beta$ , y observaron mayores niveles de componentes del mismo, como IL-18 y oligómeros ASC en sueros de pacientes <sup>256</sup>. Estos datos sugieren que MeCP2 es un factor esencial para modular la activación del inflamasoma y evitar la perpetuación de un estado inflamatorio. Hasta la actualidad poco se conoce sobre IL-1 $\beta$  en condiciones “basales” en modelos animales de RTT, más bien se ha investigado principalmente la relación entre MeCP2 e IRAK1. IRAK1 es una quinasa asociada al receptor de IL-1 (IL-1R). IRAK1 juega un rol central en respuestas inflamatorias regulando la expresión de genes inflamatorios en células inmunes<sup>257</sup>. En cerebros de ratones MeCP2-*null* se observó que el gen que codifica para IRAK1 se halla aumentado en cerebelo y corteza, afectando principalmente tejidos neuronales<sup>258</sup>. En particular, se evidenció que un aumento del receptor para IL-1 o una señalización excesiva de IL-1 $\beta$ , impactó sobre la morfología neuronal y la función sináptica mediada por una sobreexpresión de MeCP2<sup>259</sup>. Aunque en el presente trabajo no se estudió el nivel de expresión para IRAK1 o la señalización mediada por IL1 $\beta$  en el contexto de la EAE, se puede inferir que mutaciones en MeCP2 alteran el control de la expresión de IL-1 $\beta$  y vías de señalización *downstream* mediadas a través de su receptor. Posiblemente esta alteración sea mantenida y regulada por mecanismos recíprocos, es decir, que van hacia ambas direcciones (MeCP2- IL-1 $\beta$ -IL-1R-IRAK1).

En la médula, se ha demostrado que es la producción sostenida de TNF $\alpha$  por macrófagos infiltrantes la que se asocia a la severidad durante la EAE al promover la inflamación y evitar crear un ambiente anti-inflamatorio necesario para la remisión de la enfermedad<sup>260</sup>. De hecho, se ha visto que el tratamiento anti-TNF $\alpha$  a partir del día 20 dpi, revierte los signos clínicos observados. En este trabajo encontramos que los animales con EAE responden con un aumento en la expresión de TNF $\alpha$ , pero los ratones MUT-EAE mostraron mayores niveles con respecto a los WT-EAE. Aunque en bajas concentraciones TNF $\alpha$  induce efectos beneficiosos al promover la defensa contra patógenos y la regulación inmune; niveles elevados del mismo se asocian a condiciones patogénicas que promueven y facilitan procesos inflamatorios y daño tisular<sup>261</sup>. En el estudio en pacientes con RTT, TNF $\alpha$  es una citoquina de gran interés ya que el análisis del perfil de citoquinas ha mostrado un aumento persistente en la expresión de la misma<sup>149</sup>. Se considera que MeCP2 sería posiblemente un regulador negativo para la transcripción de este gen, al menos en células mieloides, tal como se discutió en la primera parte de esta tesis<sup>218,220,262</sup>. De todas maneras, en condiciones control (animales CFA) no observamos diferencias significativas entre los niveles de expresión de TNF $\alpha$ , indicando que la activación inmune sería clave para la regulación de MeCP2 sobre ella.

Proseguimos a evaluar la quimioquina CX<sub>3</sub>CL1 y su receptor, CX<sub>3</sub>CR1 ya que la interacción CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 media la comunicación entre neuronas y microglia, la cual es fundamental para modular actividades fisiológicas durante el desarrollo, la adultez y el envejecimiento y en condiciones patológicas<sup>203</sup>. La quimioquina fractalquina (CX<sub>3</sub>CL1) se expresa en neuronas y células endoteliales, actuando como una molécula de adhesión o un quimioattractante soluble<sup>203</sup>. CX<sub>3</sub>CL1 señala a través de su receptor CX<sub>3</sub>CR1, que se expresa principalmente en microglia, monocitos/macrófagos, células dendríticas y NK<sup>263</sup>. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión de fractalquina entre WT y MUT, pero sí de su receptor. Una mayor señalización vía CX<sub>3</sub>CR1 puede proteger contra una microgliosis neurotóxica y, por otra parte, el tratamiento con antagonistas de CX<sub>3</sub>CR1, conduce a una mayor vulnerabilidad neuronal<sup>203</sup>. En este aspecto, se observó que inyecciones de LPS en un modelo de ratón CX<sub>3</sub>CR1<sup>-/-</sup>, provocan una marcada neurotoxicidad microglial. Además, en un modelo tóxico de Parkinson y de esclerosis lateral amiotrófica, ratones CX<sub>3</sub>CR1<sup>-/-</sup> mostraron una extensa pérdida de células neuronales<sup>264</sup>. En modelos MeCP2-*null*, la ablación de CX<sub>3</sub>CR1 prolonga la vida media de ratones, y se rectifican los parámetros respiratorios y anomalías histológicas en cerebro<sup>265</sup>. Sin embargo, en este estudio, los niveles de ARNm medidos para CX<sub>3</sub>CR1 en ratones MeCP2-*null* no fueron significativamente mayores con respecto a los WT, al analizarlo a nivel de hipocampo, estriado, médula, cerebelo y

corteza. Nuestros resultados mostraron niveles similares entre WT-CFA y MUT-CFA, pero cuando fueron inmunizados con MOG, los niveles de expresión CX<sub>3</sub>CR1 en ratones WT aumentaron y no así en MUT. En el mismo sentido, la inducción de EAE en un modelo de ratones KO para CX<sub>3</sub>CR1, los animales mostraron signos clínicos más severos asociados a una mayor acumulación de células inmunes en el SNC<sup>204,266</sup>. Es decir, que el significado potencialmente patológico de la interacción entre neurona-microglia mediado por CX<sub>3</sub>CR1 dependerá de mecanismos específicos de cada desorden y por ende, podrá ser distinto en condiciones inflamatorias patológicas o fisiológicas en el contexto de una mutación en MeCP2<sup>265</sup>.

Hasta este punto, nuestros resultados indicarían que la deficiencia de MeCP2 en macrófagos/microglia y el consecuente desbalance en la expresión de genes principalmente asociados a este linaje celular (lo cual va en línea con lo reportado por nuestros experimentos *in-vitro*), contribuyen activamente a promover respuestas aberrantes durante la EAE. Sin embargo, MeCP2 se expresa en otras células inmunes y, por ende, la susceptibilidad para el desarrollo de la EAE y la deficiencia en contrarrestar el proceso inflamatorio agudo hacia la remisión parcial en la etapa crónica, estará asociado a otras poblaciones inmunes y citoquinas liberadas por ellas. En este sentido, se ha reportado que la pérdida total de MeCP2 en células T CD4<sup>+</sup> afecta la activación dependiente de citoquinas de STAT1 que es necesaria para la diferenciación de las células Th1<sup>153</sup>. Sin embargo, también se ha evidenciado que la sobreexpresión de MeCP2 en células T CD4<sup>+</sup> afecta la diferenciación a células Th1, demostrado por niveles bajos de producción de IFN $\gamma$  y en consecuencia llevando a un fenotipo inmunosupresor<sup>151</sup>. Estos antecedentes se contraponen con nuestros resultados ya que los niveles de expresión para IFN $\gamma$  fueron significativamente mayores durante la EAE crónica en médula de animales MUT respecto a los WT. Considerando estos antecedentes, todo indica que sería necesario que los niveles de MeCP2 deban mantenerse en un rango de expresión muy ajustado para ser funcionalmente apropiada la regulación en la expresión de ciertos genes, como sería el caso de IFN $\gamma$ . De manera similar, en células T de pacientes con RTT observaron niveles de expresión disminuidos de T-bet<sup>267</sup>, el cual es un factor de transcripción determinante para la expresión de IFN $\gamma$  bajo condiciones de activación en células Th1<sup>268</sup>. Por otro lado, en células T de pacientes que presentan sobreexpresión de MeCP2, esta proteína interfiere con la producción de IFN $\gamma$  al actuar como un represor y regulador de la accesibilidad del *locus* de IFN $\gamma$ . Sin embargo, se ha reportado que T-bet puede anular la modificación epigenética represiva dada por MeCP2 al actuar a través de T-box (factor de transcripción) para forzar la activación de la expresión del gen de IFN $\gamma$ <sup>269</sup>. Esto indica que la posible regulación génica para la expresión de IFN $\gamma$  puede ser dependiente o independiente

de MeCP2 y, por lo tanto, resulta mucho más compleja de lo pensado ya que tal regulación, además, será dependiente de las condiciones *in-vivo*.

Durante la EAE la citoquina IFN $\gamma$  actúa de manera etapa-dependiente; ya que en la etapa aguda, es patogénica y durante la etapa crónica promueve la inmunosupresión<sup>270</sup>. Sin embargo, a la luz de nuestros resultados, la citoquina IFN $\gamma$  en ratones MUT estaría participando más bien en exacerbar el perfil inflamatorio más que en promover la inmunoregulación. Esta citoquina puede actuar como una espada de doble filo ya que, por un lado, promueve respuestas Th1 y la migración de células T al sitio de inflamación, amplifica una cascada inflamatoria a través de su capacidad para mediar eventos de señalización, lo cual lleva a la producción de moléculas inflamatorias<sup>271,272</sup>. Por el otro, la intensidad de la inflamación inducida por Th1, lo cual se cuantifica por la producción de IFN $\gamma$ , potencialmente desencadena en el sistema inmune un mecanismo de control<sup>273</sup>. Durante la EAE crónica, IFN $\gamma$  promueve la inducción de FoxP3 y la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> a células T regulatorias, las cuales mediarán el proceso de balance hacia un perfil Th2<sup>273</sup>. La etapa crónica de la EAE es caracterizada por infiltrados en cerebro, lo cual se asocia a una producción local de IFN $\gamma$ , ausencia de IL-17 y permanencia local de un alto porcentaje de células Treg FoxP3<sup>+</sup><sup>196</sup>.

FoxP3 es un factor de transcripción nuclear de células Treg que median la tolerancia y homeostasis inmune<sup>274</sup>. El efecto principal de células Treg FoxP3<sup>+</sup> durante la EAE es la de controlar la proliferación de células autorreactivas y la producción de citoquinas en el SNC<sup>275</sup>. Durante la etapa aguda las células Treg no son capaces de frenar la actividad de células efectoras específicas para MOG y, en la etapa crónica, una mayor frecuencia de células Treg en el SNC se correlaciona con la recuperación de la EAE<sup>276,277</sup>. Sin embargo, es el ambiente inflamatorio dado por las citoquinas lo que determina si las Treg controlarán o no la inflamación autoinmune<sup>277</sup>. Al evaluar el nivel de expresión de FoxP3 en médulas de animales MUT, no observamos diferencias significativas entre animales MUT-CFA y MUT-EAE, indicando que en estos animales no se pudo inducir su expresión como en los WT. Se demostró que la expresión de FoxP3 es controlada por modificaciones epigenéticas<sup>278</sup> y MeCP2 parece ser un factor importante mediando su expresión. En este aspecto, se reportó en ratones KO para MeCP2 específicamente en células Treg, MeCP2 es requerida para mantener la expresión de FoxP3 cuando estas células son activadas<sup>164</sup>. Considerando este antecedente, podemos afirmar que este efecto también ocurre en nuestro modelo animal, ya que los niveles de expresión de FoxP3 en animales MUT-EAE fueron significativamente más bajos que en el grupo WT-EAE (**Figura 31.I**). En general, la expresión de FoxP3 en Treg suele ser estable<sup>274</sup> y bajo ciertas condiciones inflamatorias puede disminuir su expresión. Bajo este

escenario, la mayoría de esas células exTreg pasan a transformarse en células T efectoras<sup>279</sup>. Sin embargo, la falla o deficiencia en la regulación epigenética dada por MeCP2 explicaría en parte porqué se adelanta el inicio de la EAE y se presentan signos clínicos más severos en ratones MUT. En conjunto, todo indica que mutaciones en MeCP2 alteran la capacidad regulatoria potencial dada por IFN $\gamma$  y en gran parte, esa alteración se presenta de manera intrínseca y dependiente de cada tipo celular al regular directamente la expresión de factores responsables del establecimiento de un perfil inmunosupresor o inflamatorio.

Las células Treg pueden producir mensajeros solubles con capacidad supresora como TGF- $\beta$ , IL-10 y adenosina. Durante la EAE crónica, aproximadamente el 50% de células Treg secretan IL-10 en el SNC<sup>277</sup>. La citoquina IL-10 es inmunoreguladora por excelencia y deficiencias en su expresión llevan a estados de autoinmunidad espontánea<sup>280</sup>. Nuestros resultados mostraron que ratones MUT-EAE expresan IL-10 en médula espinal, pero en bajos niveles comparado con los WT. De hecho, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo CFA-MUT y EAE-MUT (**Figura 31.E**). Los resultados del presente trabajo, son similares a los observados en ratones KO para IL-10, los cuales son más susceptibles a desarrollar EAE más severa y sus células T exhiben una proliferación antígeno específica más fuerte al producir mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ )<sup>248,281</sup>. A su vez, durante la etapa crónica, las células mieloides cambian su fenotipo M1 a M2 en el SNC<sup>244</sup>. Por lo tanto, en lo que respecta a procesos inmunoregulatorios, mutaciones en MeCP2 podrían estar afectando la liberación de citoquinas en células FoxP3+, pero también podrá actuar evitando la dediferenciación de células mieloides y preservando el perfil pro-inflamatorio en médula (como se evidenció en la parte I de esta tesis). En líneas generales, podemos afirmar que la deficiencia de MeCP2 ejerce efectos deletéreos en la capacidad de responder adecuadamente durante un proceso neuroinflamatorio al no poder expresar respuestas inmunoregulatorias y anti-inflamatorias necesarias para la resolución inflamatoria y la protección tisular.

Podemos especular que un conjunto de genes inmunorreguladores son modulados por MeCP2 en un delicado equilibrio que dependerá de la característica divergente de esta proteína. Esto es porque MeCP2 puede reforzar la metilación del ADN (reprimiendo la expresión génica) o provocar la acetilación de histonas (activación de genes)<sup>282</sup>. Lo que aún no se entiende es la mecánica detrás de estos procesos en el contexto de condiciones pro- vs anti-inflamatorias. Es importante señalar que pacientes con RTT, no muestran inmunosupresión, más bien muestran un perfil proinflamatorio<sup>146,283</sup>. Dichas discrepancias, entre lo reportado en modelos animales KO y en pacientes, tienen que ver con los diferentes grados de pérdida de función de MeCP2: pacientes con RTT que portan mutaciones

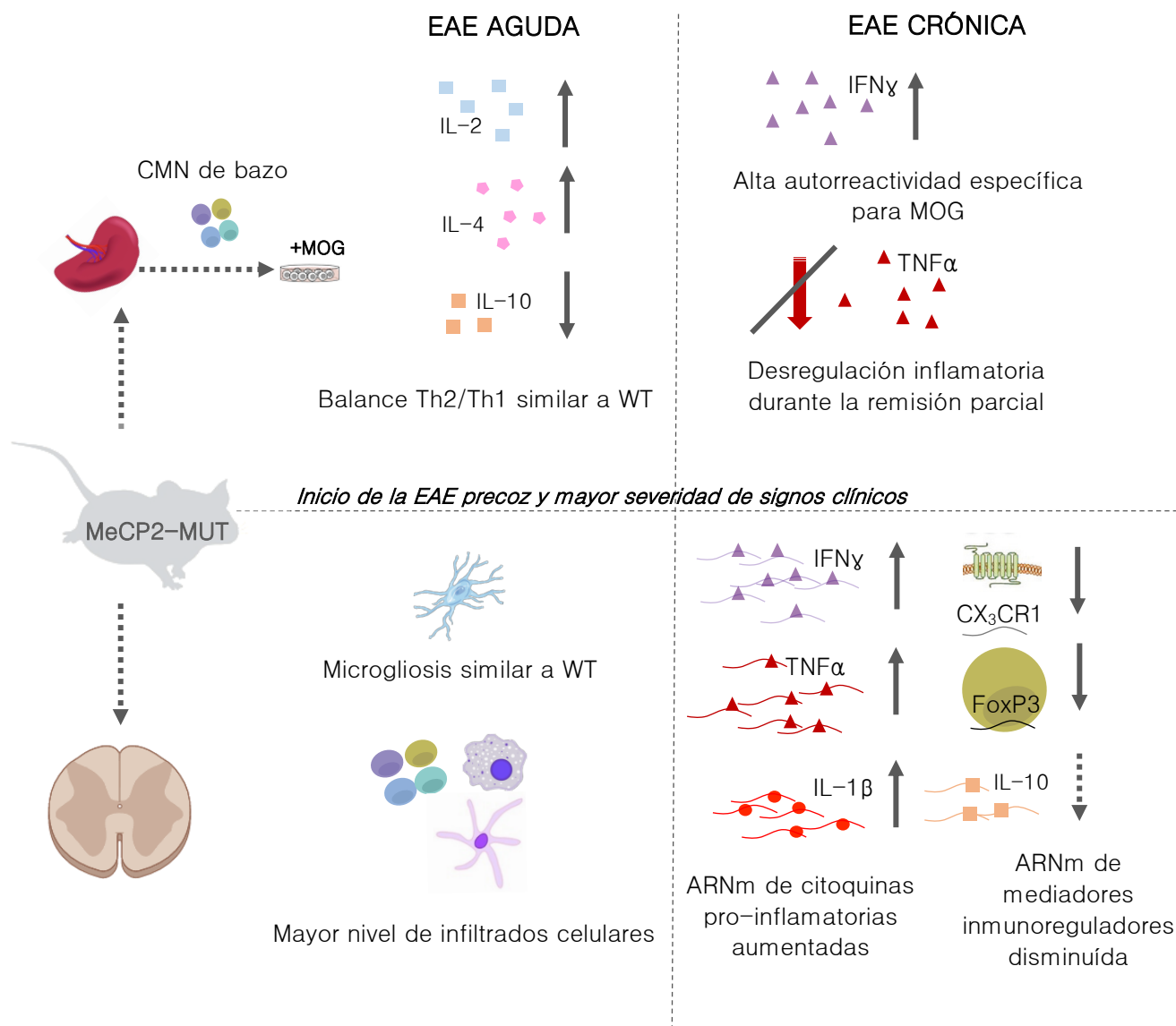
heterocigotas para MeCP2 en su mayoría, no muestran grandes alteraciones inmunes basales, tal como en ratones heterocigotas<sup>153</sup>. En vista de las diversas posibilidades en que los niveles de expresión de MeCP2, su activación y co-factores estarán involucrados en su función, refuerza la propiedad de su gran multifuncionalidad y complejidad<sup>153</sup>. Por ello, existe una amplia falta de concordancia entre genes desregulados por mutaciones o ausencia de MeCP2 evaluados en diferentes estudios. Esto puede ser atribuido a diferentes aspectos, como el uso de distintos modelos, tejidos, edad y metodología<sup>42,164,165,220,234</sup>. Se podría esperar un alto nivel de concordancia en estudios donde se utilizaron las mismas condiciones de estudio, sin embargo, este no es el caso, lo cual demuestra la complejidad de este desorden y cuán delicada es la regulación génica de MeCP2, tanto espacial como temporalmente. De esta manera, nuestro trabajo provee una visión general para comenzar a describir la complejidad de las interacciones neuroinmunológicas en el contexto de mutaciones en MeCP2.

A la luz de nuestros resultados podemos afirmar que mutaciones en MeCP2 producen una respuesta inflamatoria exacerbada en el contexto de la EAE y provee una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Lo interesante de los resultados obtenidos es que en ningún caso para las citoquinas analizadas a partir de médula y de sobrenadantes de cultivos celulares de tejidos de animales mutantes, se encontraron diferencias significativas con respecto a los WT en condiciones control (CFA). Esto indica en primer lugar, que la deficiencia de MeCP2 conduce a que en el organismo en el que se exprese, sea más susceptible y vulnerable a desarrollar respuestas inflamatorias exacerbadas e inmunoregulatorias deficientes. En segundo lugar, que la activación inmune es necesaria para que MeCP2 determine la expresión, de manera directa o indirecta, de ciertos genes que mediarán la respuesta final. En esta tesis pudimos determinar que tal respuesta fue favorecida hacia un perfil encefalitogénico.



# RESUMEN GRÁFICO DE RESULTADOS

**MeCP2 ES ESENCIAL PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE A NIVEL PERIFÉRICO Y LOCAL (SNC) EN EL CONTEXTO DE UN DESAFÍO AUTOINMUNE**





# CONCLUSIONES

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo pudimos demostrar que:

- En células inmunes, la deficiencia de MeCP2 genera efectos diferentes a los observados cuando MeCP2 está ausente completamente.
- Esta deficiencia genera mayor susceptibilidad al desarrollo de estados inflamatorios y autoinmunes.
- Los principales defectos en respuestas inmunes mediados por MeCP2 dependen de su activación.
- Existe un balance pro/anti inflamatorio alterado.

La relevancia de nuestros resultados reside en que:

- Es el primero en demostrar que la expresión de MeCP2 en macrófagos sería importante para el desarrollo de respuestas inmunoregulatorias al ser estimuladas con IL-4.
- Refuerza el rol protagónico potencial de las células mieloides como intermediarias para el mantenimiento de la patogénesis en RTT.
- Concuerdan con lo reportado en pacientes con RTT y con duplicaciones de MeCP2 ya que observamos un perfil inflamatorio exacerbado y desregulado.

Nuestros resultados son relevantes para entender cómo el sistema neuroinmune mantiene el estado patogénico en RTT y otras patologías asociadas a MeCP2. Este trabajo abrió nuevos interrogantes que resultan de gran relevancia. En la segunda parte de la tesis podemos establecer que mutaciones en MeCP2 actúan de manera intrínseca en distintas poblaciones celulares afectando las interacciones neuroinmunes al promover un medio inflamatorio y un desbalance en la inmunoregulación. Sería interesante evaluar la cinética de las distintas poblaciones celulares y su fenotipo inflamatorio durante la EAE. Este punto

excedió los objetivos propuestos para esta tesis, pero para futuros experimentos podría resultar altamente enriquecedor comprender cómo MeCP2 interfiere con respuestas necesarias para enfrentar una injuria inmune directamente en cada población celular involucrada.

MeCP2 se comporta de manera versátil de acuerdo a su nivel de expresión y el ambiente inmune en el que actúa, en consecuencia, la activación de MeCP2 podría estar regulando procesos de expresión génica específicos. Todo indica que hay vías moleculares que son reguladas por MeCP2 de manera tejido y célula específica. MeCP2 sufre diversas modificaciones post-traduccionales que regulan su función. Por lo tanto, evaluar si en presencia de ciertos estímulos y estados de activación de células inmunes, la función de MeCP2 depende de ciertos sitios de fosforilación presentes en la forma truncada de la proteína. Este análisis será de gran relevancia primero, porque en macrófagos nada se sabe sobre posibles modificaciones post-traduccionales de MeCP2 en el contexto de una activación inmune. Segundo, porque conocer si la proteína truncada modula funciones inmunes esenciales en condiciones de activación, dará luz en la interpretación de la potencial función “parcial o residual” de MeCP2, lo cual representa la expresión de MeCP2 en pacientes. Además, considerando la poca información que existe sobre mecanismos que involucren a MeCP2 sobre respuestas anti-inflamatorias e inmunoregulatorias, un primer paso a seguir sería determinar posibles vías de señalización alteradas por mutaciones en MeCP2. Finalmente, evaluar posibles genes blanco susceptibles a una regulación epigenética. Estos estudios podrán sentar las bases para comprender la patogénesis molecular y celular subyacente de RTT, y diseñar estrategias terapéuticas efectivas.

# INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Manifestaciones clínicas en Síndrome de Rett. **(Pág. 9)**
- Figura 2.** Estructura del gen y proteína MeCP2. **(Pág. 12)**
- Figura 3.** Sitios de fosforilación en MeCP2. **(Pág. 15)**
- Figura 4.** Modelos funcionales de MeCP2. **(Pág. 16)**
- Figura 5.** Heterogeneidad de macrófagos. **(Pág. 24)**
- Figura 6.** Fenotipos M1 y M2 de macrófagos. **(Pág. 25)**
- Figura 7.** El inflammasoma y sus vías de activación en macrófagos M1. **(Pág. 27)**
- Figura 8.** Diferenciación de células T CD4+. **(Pág. 33)**
- Figura 9.** Interacciones neuroinmunes. **(Pág. 36)**
- Figura 10.** Mecanismo de patogenicidad en la EAE. **(Pág. 43)**
- Figura 11.** Diseño experimental para la obtención de MDMO. **(Pág. 53)**
- Figura 12.** Diseño experimental para la inducción de la EAE. **(Pág. 57)**
- Figura 13.** Análisis de microgliosis en criosecciones de médula. **(Pág. 61)**
- Figura 14.** Análisis de los infiltrados celular en médula lumbar. **(Pág. 62)**
- Figura 15.** Nivel de expresión del marcador CD11b en células aisladas de médula ósea y diferenciadas en presencia de M-CSF por 6 días. **(Pág. 70)**
- Figura 16.** Expresión relativa de genes prototípicos en respuestas M1. **(Pág. 72)**
- Figura 17.** Expresión relativa de genes prototípicos en respuestas M2. **(Pág. 74)**
- Figura 18.** Niveles del radical superóxido en MDMO estimulados. **(Pág. 75)**
- Figura 19.** Niveles de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de MDMO. **(Pág. 76)**
- Figura 20.** Evaluación clínica de la EAE. **(Pág. 79)**
- Figura 21.** Caracterización de la severidad de la EAE. **(Pág. 81)**
- Figura 22.** Producción de citoquinas por CMN aisladas de bazo en etapa aguda. **(Pág. 83)**
- Figura 23.** Balance Th2/Th1 en CMN-WT y CMN-MUT reestimuladas con MOG. **(Pág. 85)**
- Figura 24.** Producción de citoquinas por CMN aisladas de bazo en etapa crónica. **(Pág. 86)**
- Figura 25.** Regulación en los niveles de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  desde la etapa aguda a crónica. **(Pág. 88)**

- Figura 26.** Nivel de proliferación de CMN aisladas de bazo en presencia de MOG *in-vitro*.  
**(Pág. 89)**
- Figura 27.** Marcación histológica de células infiltrantes en médula. **(Pág. 90)**
- Figura 28.** Análisis histopatológico en médula. **(Pág. 92)**
- Figura 29.** Marcación por inmunohistoquímica de células microgliales Iba-1+. **(Pág. 94)**
- Figura 30.** Análisis de microgliosis en médula espinal. **(Pág. 96)**
- Figura 31.** Expresión génica relativa de Iba-1 en médula. **(Pág. 97)**
- Figura 32.** Nivel de expresión génica de citoquinas y mediadores inflamatorios en médula. **(Pág. 98)**
- Figura 33.** Inmunorreactividad humoral en suero de animales WT y MUT para MeCP2.  
**(Pág. 105)**
- Figura 34.** Inmunorreactividad humoral en suero de hembras heterocigotas para la mutación para MeCP2. **(Pág. 106)**
- Figura 35.** Nivel de especies reactivas del oxígeno en sangre total de animales MUT y WT para MeCP2. **(Pág. 107)**

# INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Fenotipos característicos del modelo MUT (MeCP2<sup>308/y</sup>). Resumen de las características típicas del modelo utilizado en esta tesis y de importancia clínica en RTT.

**(Pág. 49)**

**Tabla 2.** Secuencia de cebadores o *primers* para las PCR destinadas a la genotipificación de ratones. **(Pág. 52)**

**Tabla 3.** Especificación de scores clínicos para la cola y patas traseras en ratones inmunizados con MOG. Signos clínicos tienen un mínimo de 0 (cuando no hay signos clínicos visibles) y máximo de 8 (cuando hay parálisis total desde la región medial del cuerpo hasta la cola). **(Pág. 59)**

**Tabla 4.** Escala de puntuación utilizada para obtener el nivel de infiltrados en médula en los compartimientos de meninges y parénquima se describe en la tabla. **(Pág. 62)**

**Tabla 5.** Secuencia de los cebadores o *primers* utilizados para analizar la expresión relativa de los genes blancos de interés en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) expuestos a distintos estímulos (Parte I) y en médulas de animales MUT y WT expuestos a MOG o sólo a CFA (Parte II). **(Pág. 67)**



# BIBLIOGRAFÍA



1. De Felice C, Leoncini S, Signorini C, et al. Rett syndrome: An autoimmune disease? *Autoimmun Rev.* 2016;15(4):411-416.
2. Lombardi LM, Baker SA, Zoghbi HY. MECP2 disorders: From the clinic to mice and back. *J Clin Invest.* 2015;125(8):2914-2923.
3. Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron.* 2007;56(3):422-437.
4. Cosentino L, Vigli D, Franchi F, Laviola G, Filippis B De. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Rett syndrome before regression: A time window of overlooked opportunities for diagnosis and intervention. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;107(May):115-135.
5. Einspieler C, Marschik PB. Regression in Rett syndrome: Developmental pathways to its onset. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;98:320-332.
6. Roche L, Zhang D, Bartl-Pokorny KD, et al. Early Vocal Development in Autism Spectrum Disorder, Rett Syndrome, and Fragile X Syndrome: Insights from Studies Using Retrospective Video Analysis. *Adv Neurodev Disord.* 2018;2(1):49-61.
7. Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: When DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet.* 2006;7(6):415-426.
8. Percy A. Rett Syndrome: Coming to Terms with Treatment. *Adv Neurosci.* 2014;2014:1-20.
9. Glaze DG. Neurophysiology of Rett syndrome. *Brain Dev.* 2001;23 Suppl 1(9):S50-7.
10. Roze E, Cochen V, Sangla S, et al. Rett syndrome: An overlooked diagnosis in women with stereotypic hand movements, psychomotor retardation, Parkinsonism, and dystonia? *Mov Disord.* 2007;22(3):387-389.
11. Percy KA, Lane BJ, Childers J, et al. Rett syndrome: North American database. *J Child Neurol.* 2007;22(12):1338-1341.
12. Cuddapah VA, Pillai RB, Shekar K V, et al. Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) mutation type is associated with disease severity in Rett Syndrome. *J Med Genet.* 2014;51(3):152-158.
13. Smeets EEJ, Pelc K, Dan B. Rett Syndrome. *Mol Syndromol.* 2011;2(3-5):113-127.
14. Glaze DG. Rett syndrome: of girls and mice? lessons for regression in autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(2):154-158.
15. Armstrong D. Neuropathology of Rett syndrome. *J Child Neurol.* 2005;20(9):747-753.

16. Jellinger K, Armstrong D, Zoghbi HY, Percy AK, Boltzmann L, Wien A. Neuropathology of Rett syndrome. *Acta Neuropathologica*. 1988;142-158.
17. Reiss AL, Faruque F, Naidu S, et al. Neuroanatomy of Rett Syndrome: A Volumetric Imaging Study. *Ann Neurol*. 1993;34:227-234.
18. Rose SA, Wass S, Jankowski JJ, Feldman JF. Impaired visual search in children with Rett Syndrome. *Pediatr Neurol*. 2019;92:26-31.
19. Banerjee A, Miller MT, Li K, Sur M, Kaufmann WE. Towards a better diagnosis and treatment of Rett syndrome: a model synaptic disorder. *Brain*. 2019;142:239-248.
20. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999;23:185-188.
21. Alashti SK, Fallahi J, Mohammadi S, Dehghanian F. Two novel mutations in the MECP2 gene in patients with Rett syndrome. *Gene*. 2020;732:144337.
22. Girard M, Couvert P, Carrié A, et al. Parental origin of de novo MECP2 mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(3):231-236.
23. Calfa G, Percy AK, Pozzo-Miller L. On Experimental Models of Rett Syndrome Bases on MeCP2 Dysfunction. *Exp Biol Med*. 2011;236(1)3-19.
24. Braunschweig D, Simcox T, Samaco RC, Lasalle JM. X-Chromosome inactivation ratios affect wild-type MeCP2 expression within mosaic Rett syndrome and *Mecp2* 2 / 1 mouse brain. *Human Mol Genet*. 2004;13(12)1275-86.
25. Zhang Q, Yang X, Wang J, Li J, Wu Q. Genomic mosaicism in the pathogenesis and inheritance of a Rett syndrome cohort. *Genet Med*. 2019;21(6):2-10.
26. Takahashi S, Takeguchi R, Kuroda M, Tanaka R. Atypical Rett syndrome in a girl with mosaic triple X and MECP2 variant. *Mol Genet Genomic Med*. 2020:1-6.
27. Bedogni F, Rossi RL, Galli F, et al. *Rett syndrome and the urge of novel approaches to study MeCP2 functions and mechanisms of action*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;46:187-201.
28. Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A. The role of MeCP2 in the brain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:631-652.
29. Ausió J, de Paz AM artíne., Esteller M. MeCP2: the long trip from a chromatin protein to neurological disorders. *Trends Mol Med*. 2014;20(9):487-498.
30. Ehrhart F, Coort SLM, Cirillo E, Smeets E, Evelo CT, Curfs LMG. Rett syndrome - Biological pathways leading from MECP2 to disorder phenotypes. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):1-13.
31. Liyanage VRB, Rastegar M. Rett syndrome and MeCP2. *NeuroMolecular Med*. 2014;16(2):231-264.

32. Leonard H, Cobb S, Downs J. Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nat Rev Neurol*. 2016;13(1):37-51.
33. Spiga O, Gardini S, Rossi N, Cicaloni V, Pettini F, Niccolai N. Structural investigation of Rett-inducing MeCP2 mutations. *Genes Dis*. 2019;6(1):31-34.
34. Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet*. 2002;11(2):115-124.
35. De Leguerre S, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L. In sickness and in health: the role of methyl-CpG binding protein 2 in the central nervous system. *Eur J Neurosci*. 2011;33(9):1563-1574.
36. Kishi N, Macklis JD. MeCP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci*. 2004;27(3):306-321.
37. Na ES, Monteggia LM. The role of MeCP2 in CNS development and function. *Horm Behav*. 2011;59(3):364-368.
38. Zachariah RM, Olson CO, Ezeonwuka C, Rastegar M. Novel MeCP2 Isoform-Specific Antibody Reveals the Endogenous MeCP2E1 Expression in Murine Brain, Primary Neurons and Astrocytes. *PLoS one*. 2012;7(11):24-28.
39. Wither RG, Lang M, Zhang L, Eubanks JH. Regional MeCP2 expression levels in the female MeCP2-deficient mouse brain correlate with specific behavioral impairments. *Exp Neurol*. 2013;239:49-59.
40. Jung BP, Jugloff DGM, Zhang G, Logan R, Brown S, Eubanks JH. The expression of Methyl CpG Binding Factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol*. 2003;55(1):86-96.
41. Nguyen MVC, Felice CA, Du F, et al. Oligodendrocyte lineage cells contribute unique features to Rett syndrome neuropathology. *J Neurosci*. 2013;33(48):18764-18774.
42. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, et al. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*. 2012;484(7392):105-109.
43. Lioy DT, Garg SK, Monaghan CE, et al. A role for glia in the progression of Rett-syndrome. *Nature*. 2011;475(7357):497-500.
44. Bellini E, Pavesi G, Barbiero I, et al. MeCP2 post-translational modifications: a mechanism to control its involvement in synaptic plasticity and homeostasis? *Front Cell Neurosci*. 2014;8(August):1-15.
45. Chen WG, Chang Q, Lin Y, et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. 2003;302(5646):885-889.

46. Cohen S, Gabel HW, Hemberg M, et al. genome-wide activity-dependent MeCP2 phosphorylation regulates nervous system development and function. *Neuron*. 2011;72(1):72-85.
47. Zhong X, Li H, Kim J, Chang Q. Regulation of neural differentiation, synaptic scaling and animal behavior by MeCP2 phosphorylation. *Neurobiol Learn Mem*. 2019;165:106859.
48. Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, et al. brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*. 2006;52(2):255-269.
49. Lyst MJ, Ekiert R, Ebert DH, et al. Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat Neurosci*. 2013;16(7):898-902. doi:10.1038/nn.3434
50. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325:834-840.
51. Miyake K, Nagai K. Phosphorylation of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) regulates the intracellular localization during neuronal cell differentiation. *Neurochem Int*. 2007;50(1):264-270.
52. Diaz de Leon Guerrero S, Pedraza-Alva G, Perez-Martinez L. In sickness and in health: the role of methyl-CpG binding protein 2 in the central nervous system. 2011;33(9):1563-1574.
53. Mellen M, Ayata P, Dewel S, Kriaucionis S, Heintz N. MeCP2 binds to 5hmc enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*. 2012;151(7):1417-1430.
54. Karaca KG, Brito DVC. MeCP2: a critical regulator of chromatin in neurodevelopment and adult brain function. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(18):4577.
55. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*. 2008;320(5880):1224-1229.
56. Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res*. 2013;23(11):1256-1269.
57. Li Y, Wang H, Muffat J, et al. Global transcriptional and translational repression in human-embryonic- stem-cell-derived Rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):446-458.
58. Lavery LA, Zoghbi HY. The distinct methylation landscape of maturing neurons and its role in Rett syndrome pathogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2019;59:180-188.

59. Tillotson R, Selfridge J, Koerner M V., et al. Radically truncated MeCP2 rescues Rett syndrome-like neurological defects. *Nature*. 2017;550(7676):398-401.
60. Rastegar M, Hotta A, Pasceri P, et al. MECP2 isoform-specific vectors with regulated expression for Rett Syndrome gene therapy. *PLoS One*. 2009;4(8).
61. Cusack SM, Rohn TT, Medeck RJ, et al. Suppression of MeCP2 $\beta$  expression inhibits neurite extension in PC12 cells. *Exp Cell Res*. 2004;299(2):442-453.
62. Vogel Ciernia A, Yasui DH, Pride MC, et al. MeCP2 isoform e1 mutant mice recapitulate motor and metabolic phenotypes of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*. 2018;27(23):4077-4093.
63. Belichenko P V., Wright EE, Belichenko NP, et al. Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: Evidence for disruption of neuronal networks. *J Comp Neurol*. 2009;514(3):240-258.
64. Maezawa I, Jin LW. Rett Syndrome Microglia Damage Dendrites and Synapses by the Elevated Release of Glutamate. *J Neurosci*. 2010;30(15):5346-5356.
65. Kishi N, Macklis JD. MeCP2 functions largely cell-autonomously, but also non-cell-autonomously, in neuronal maturation and dendritic arborization of cortical pyramidal neurons. *Exp Neurol*. 2010;222(1):51-58.
66. Jiang M, Ash RT, Baker SA, et al. Dendritic Arborization and Spine Dynamics Are Abnormal in the Mouse Model of MECP2 Duplication Syndrome. *J Neurosci*. 2013;33(50):19518-19533.
67. Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, et al. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron*. 2002;35(2):243-254.
68. Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, et al. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci*. 2006;26(1):319-327.
69. Weng SM, McLeod F, Bailey MES, Cobb SR. Synaptic plasticity deficits in an experimental model of Rett syndrome: Long-term potentiation saturation and its pharmacological reversal. *Neurosci*. 2011;180:314-321.
70. Li H, Zhong X, Chau KF, Williams EC, Chang Q. Loss of activity-induced phosphorylation of MeCP2 enhances synaptogenesis, LTP and spatial memory. *Nat Neurosci*. 2011;14(8):1001-1008.
71. Blackman MP, Djukic B, Nelson SB, Turrigiano GG. A critical and cell-autonomous role for MeCP2 in synaptic scaling up. *J Neurosci*. 2012;32(39):13529-13536.

72. Asaka Y, Jugloff DGM, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the MeCP2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis.* 2006;21(1):217-227.
73. Nguyen MVC, Du F, Felice C a, et al. MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. *J Neurosci.* 2012;32(29):10021-10034.
74. Giacometti E, Luikenhuis S, Beard C, Jaenisch R. Partial rescue of MeCP2 deficiency by postnatal activation of MeCP2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(6):1931-1936.
75. Luikenhuis S, Giacometti E, Beard CF, Jaenisch R. Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(16):6033-6038.
76. Lyst MJ, Bird A. Rett syndrome: A complex disorder with simple roots. *Nat Rev Genet.* 2015;16(5):261-274.
77. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet.* 2001;27(3):322-326.
78. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(10):971-974.
79. Tang D, Kang R, Coyne C, Zeh H, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signals 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* 2013;249(1):158-175.
80. Jain A, Pasare C, Alerts E. Innate control of adaptive immunity: beyond the three-signal paradigm. *J Immunol.* 2017;198:3791-3800.
81. Natoli G, Stunnenberg HG, Neill LAJO, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease *Science.* 2016;352(6284):aaf10981-10.
82. Iwasaki A, Medzhitov R, Haven N. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2015;16(4):343-353.
83. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in Inflammation. *Curr Drug Targets.* 2005;4:281-286.
84. Claesson-welsh L, Claesson-welsh L. Vascular permeability — the essentials. *Upsala J Med.* 2015;120(3):125-143.
85. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell.* 2015;160(5):816-827.
86. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 2014;5(oct):1-22.

87. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(December):846-852.
88. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 2011;327(5966):656-661.
89. Lavin Y, Merad M. Macrophages: Gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(4):201-209.
90. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010;327(February):1098-1102.
91. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-969.
92. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6(March):1-13.
93. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Bioscience*. 2008;13(4):453-461.
94. Hume DA, Irvine KM, Pridans C. The Mononuclear Phagocyte System: The relationship between monocytes and macrophages. *Trends Immunol*. 2019;40(2):98-112.
95. Kayagaki N, Wong M., Stowe I., et al. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science*. 2013;341(June):1246-1249.
96. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014;5(nov):1-9.
97. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004;75(6):639-653.
98. Schröder NW, Opitz B, Lamping N, et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*. *J Immunol*. 2000;165(5):2683-2693.
99. Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014;395(2):203-230.
100. Yang T, Peleli M, Zollbrecht C, et al. Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric oxide-dependent mechanism. *Free Radic Biol Med*. 2015;83:159-166.
101. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, et al. Unique CD14 + intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- $\gamma$  axis. *J Clin. Invest*. 2008;118(6):2269-2280.

102. Rival C, Theas MS, Suescun MO, et al. Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J Pathol.* 2008;215:108-117.
103. Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med.* 1997;75(3):165-173.
104. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin. Inv.* 2007;117(1):175-184.
105. Bobryshev Y V, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG, Orekhov AN. Macrophages and their role in atherosclerosis: pathophysiology and transcriptome analysis. *Biomed Res.* 2016; 2016.
106. Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. *Front Pharmacol.* 2015;6:1-9.
107. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):649-665.
108. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1298-1307.
109. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, et al. novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PloS one.* 2015;10(12):5-11.
110. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):451-483.
111. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* 2008;214:161-178.
112. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002;72(July):101-106.
113. Gerber JS, Mosser DM. Reversing Lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc  $\gamma$  Receptors. *J Immunol.* 2001;166:6861-6868.
114. Celia M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:10-16.
115. Goerdts S, Orfanos CE, Franklin B. Other functions , other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 1999;10:137-142.
116. Weaver CT, Unanue ER. The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunology.* 1990;11(2):4827-4831.
117. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:1538-1543.



118. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates , functions , and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-1570.
119. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *AJP Adv Physiol Educ*. 2013;37(4):273-283.
120. Gi M, Im W, Hong S. Dendritic cells as danger-recognizing biosensors. *Sensors*. 2009;9(9):6730-6751.
121. Zhu J, Yamane H, Paul W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28(1):445-489.
122. Kent SC, Chen Y, Bregoli L, et al. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*. 2005;435(7039):224-228.
123. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(1):566-573.
124. Bellavance M., Rivest S. The neuroendocrine control of the innate immune system in health and brain diseases. *Immunol Rev*. 2012;248:36-55.
125. Nisticò R, Salter E, Nicolas C, et al. Synaptoimmunology - Roles in health and disease. *Mol Brain*. 2017;10(1):1-12.
126. Jonas RA, Yuan TF, Liang YX, Jonas JB, Tay DKC, Ellis-Behnke RG. The spider effect: Morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLoS one*. 2012;7(2).
127. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):354-365.
128. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(7):388-399.
129. Yamamuro K, Kimoto S, Rosen KM, Kishimoto T, Makinodan M. Potential primary roles of glial cells in the mechanisms of psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(May):1-11.
130. Sofroniew M V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(5):249-263.
131. Wilson EH, Weninger W, Hunter C a. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1368-1379.
132. Wraith DC, Nicholson LB. The adaptive immune system in diseases of the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1172-1179.

133. London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci.* 2013;7(April):1-10.
134. Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron.* 2009;64(1):93-109.
135. Fourgeaud L, Boulanger LM. Role of immune molecules in the establishment and plasticity of glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci.* 2010;32(2):207-217.
136. Kipnis J. Multifaceted interactions between adaptative immunity and the central Nervous System. *Science.* 2016;353(6301):766-771.
137. Pelka GJ, Watson CM, Christodoulou J, Tam PPL. Distinct expression profiles of Mecp2 transcripts with different lengths of 3'UTR in the brain and visceral organs during mouse development. *Genomics.* 2005;85:441-452.
138. Beth L. Cobb, Fei Y, Jonsson R, et al. Genetic association between methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) and primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1731-1732.
139. Sawalha AH, Webb R, Han S, et al. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2008;3(3):1-7.
140. Han T, Cho S, Kim T, Joo Y Bin, Bae S, Kang C. Association of an Activity-Enhancing Variant of IRAK1 and an MECP2 – IRAK1 haplotype with increased susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arth & Rheum.* 2013;65(3):590-598.
141. Carmona FD, Cénit MC, Broen JCA, et al. New insight on the Xq28 association with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(12).
142. Pecorelli A, Cervellati F, Belmonte G, et al. Cytokines profile and peripheral blood mononuclear cells morphology in Rett and autistic patients. *Cytokine.* 2016;77:180-188.
143. Papini AM, Nuti F, Real-Fernandez F, et al. Immune dysfunction in Rett syndrome patients revealed by high levels of serum anti-N(Glc) IgM antibody fraction. *J Immunol Res.* 2014;2014:1-6.
144. Ramaekers VT, Sequeira JM, Artuch R, et al. Folate receptor autoantibodies and spinal fluid 5-methyltetrahydrofolate deficiency in Rett Syndrome. *Neuropediatrics.* 2007;38:179-183.
145. Fiumara A, Sciotto A, Barone R, et al. Peripheral lymphocyte subsets and other immune aspects in Rett Syndrome. *Pediatr Neurol.* 1999;8994(99):619-621.
146. Cortelazzo A, De Felice C, Guerranti R, et al. Subclinical inflammatory status in Rett syndrome. *Mediators Inflamm.* 2014;2014.

147. Cortelazzo A, De Felice C, De Filippis B, et al. Persistent unresolved inflammation in the MeCP2-308 female mutated mouse model of Rett Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2017;2017.
148. Pecorelli A, Leoni G, Cervellati F, et al. Genes related to mitochondrial functions, protein degradation, and chromatin folding are differentially expressed in lymphomonocytes of Rett Syndrome Patients. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
149. Leoncini S, De Felice C, Signorini C, et al. Cytokine dysregulation in MECP2- and CDKL5-related Rett Syndrome: relationships with aberrant redox homeostasis, inflammation, and  $\omega$ -3 PUFAs. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015.
150. Byiers BJ, Merbler AM, Barney CC, et al. Evidence of altered salivary cytokine concentrations in Rett syndrome and associations with clinical severity. *Brain, Behav Immun health.* 2020;1:100008.
151. Yang T, Ramocki MB, Neul JL, et al. Overexpression of Methyl-CpG Binding Protein 2 impairs TH1 responses. *Immunology.* 2012;4(163):1-17.
152. Balmer D, Arredondo J, Samaco RC, Lasalle JM. MECP2 mutations in Rett syndrome adversely affect lymphocyte growth, but do not affect imprinted gene expression in blood or brain. *Hum Genet.* 2002;545-552.
153. Jiang S, Li C, McRae G, et al. MeCP2 reinforces STAT3 signaling and the generation of effector CD4+ T cells by promoting miR-124-mediated suppression of SOCS5. *Sci. Sign.* 2014;7(316):ra25.
154. Mates J, Perez-Gomez C, Nuñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
155. Spector A. Oxidative stress and disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2000;16(2):193-201.
156. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-748.
157. Müller M. Disturbed redox homeostasis and oxidative stress: Potential players in the developmental regression in Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;98:154-163.
158. Müller M. Disturbed redox homeostasis and oxidative stress: Potential players in the developmental regression in Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;98:154-163.
159. Di Piero D, Ciaccio C, Sbardella D, et al. Effects of oral administration of common antioxidant supplements on the energy metabolism of red blood cells. Attenuation of oxidative stress - induced changes in Rett syndrome erythrocytes by CoQ10. *Mol Cell Biochem.* 2020;463(1):101-113.

160. De Felice C, Ciccoli L, Leoncini S, et al. Systemic oxidative stress in classic Rett syndrome. *Free Radical Biol Med.* 2009;47(4):440-448.
161. Müller M, Can K. Aberrant redox homeostasis and mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(4):959-964.
162. Formichi P, Battisti C, Teresa M, Hayek G, Zappella M, Federico A. Vitamin E serum levels in Rett syndrome. *J Neurol. Sci.* 1998;156:227-230.
163. Cervellati C, Sticozzi C, Romani A, et al. Impaired enzymatic defensive activity, mitochondrial dysfunction and proteasome activation are involved in RTT cell oxidative damage. *Mol Basis Dis.* 2015;1852(10):2066-2074.
164. Li C, Jianga S, Liua S-Q, et al. MeCP2 enforces Foxp3 expression to promote regulatory T cells' resilience to inflammation. *PNAS.* 2014;111(27):2807-2816.
165. Cronk JC, Derecki NC, Ji E, et al. Methyl-CpG Binding Protein 2 regulates microglia and macrophage gene expression in response to inflammatory stimuli. *Immunity.* 2015;42(4):679-691.
166. Procaccini C, Rosa V De, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:182-191.
167. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathol.* 2007;17:210-218.
168. Marrodan M, Alessandro L, Farez MF, Correale J. The role of infections in multiple sclerosis. *Mutiple Scler J.* 2019;25(7):891-901.
169. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and environmental factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2019;8:a028944.
170. Rivers TM, Sprunt DH BG. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med.* 1933;58:39-53.
171. Glatigny S, Bettelli E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as animal models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(11):a028977.
172. Cossu D, Yokoyama K, Hattori N. Conflicting Role of Mycobacterium species in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2017;8:216.
173. Linthicum DS, Munoz J., Blaskett A. Acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol.* 1982;10:299-310.
174. Chanaday NL, Bem AF De, Roth GA. Effect of diphenyl diselenide on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Int.* 2011;59:1155-1162.

175. Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE : imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Cell*. 2011;17(3):119-125.
176. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-1106.
177. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(1):1-11.
178. Becher RB, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med*. 2006;84:532-543.
179. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Kuchroo VK, Sobel RA, Bettelli E. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*. 2009;183:7169-7177.
180. Engelhardt B. Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci*. 2008;274:23-26.
181. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010;162:1-11.
182. Wang J, Wegener JE, Huang T-W, et al. Wild type microglia do not arrest pathology in mouse models of Rett syndrome. *Nature*. 2015;521(7552):1-15.
183. Greter M, Merad M. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia*. 2013;61(1):121-127.
184. Dulgerian LR, Garrido V V., Stempin CC, Cerbán FM. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology*. 2011;133(1):29-40.
185. 177. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells a quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunochem*. 2006;27:31-44.
186. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*. 2001;408:402-408.
187. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108.

188. Harrison M, Brien AO, Adams L, et al. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *Neuroimage*. 2013;68:22-29.
189. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs . Classically and M2 (LPS-) vs alternatively activated macrophages. *Front Immunol*. 2019;10(May):1-14.
190. Cronk JC, Derecki N, Litvak V, Kipnis J. Unexpected cellular players in Rett syndrome pathology. *Neurobiol Dis*. 2015;92:64-71.
191. Trouplin V, Boucherit N, Gorvel L, Conti F, Mottola G, Ghigo E. Bone Marrow-derived macrophage production. *J Vis Exp*. 2013;81(November):1-6.
192. Marim FM, Silveira TN, Lima DS, Zamboni DS. A Method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*. 2010;5(12):1-8.
193. Mittelbronn M. The M1/M2 immune polarization concept in microglia: a fair transfer? *Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014;1(1):6.
194. Beschin A, Brys LEA, Baetselier PDE, Raes G, Noe WIM. FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *Immunol. Res*. 2002;9(3):151-159.
195. Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, et al. Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev*. 2001;23:236-239.
196. Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Graziela T, et al. Persistent inflammation in the cns during chronic eae despite local absence of IL-17 production. *Mediators Inflamm*. 2013;2013(519627).
197. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. *Annu Rev*. 2018;36:411-433.
198. Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva O V., Liu XB, Pleasure DE, Deng W. A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med*. 2013;5(6):891-903.
199. Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, et al. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia*. 2014;62(10):1724-1735.
200. Chu F, Shi M, Zheng C, et al. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol*. 2018;318(February):1-7.
201. Kahanovitch U, Patterson KC, Hernandez R. Glial dysfunction in MeCP2 deficiency models: implications for Rett Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1-18.

202. Kozłowski C, Weimer RM. An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in-vivo. *PLoS One*. 2012;7(2):1-9.
203. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Krawczyk M, et al. Analysis of the role of CX3CL1 (Fractalkine) and its receptor CX3CR1 in traumatic brain and spinal cord injury: insight into recent advances in actions of neurochemokine agents. *Mol Neurobiol*. 2017;54:2167-2188.
204. Hertwig L, Hamann I, Romero-suarez S, et al. CX<sub>3</sub>CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation. *Eur J Immunol*. 2017;46(8):1984-1996.
205. Bae K, Shim H, Balu D. Translocator Protein 18 kDa Negatively Regulates Inflammation in Microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9:424-437.
206. Avrameas S, Alexopoulos H, Moutsopoulos H. Natural Autoantibodies: An Undersung Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders—A Point of View. *Front Immunol*. 2018;9(June):1-4.
207. Tani H, Ishikawa N, Kobayashi Y, et al. Anti-MOG antibody encephalitis mimicking neurological deterioration in a case of Rett syndrome with MECP2 mutation. *Brain Dev*. 2018;40(10):943-946.
208. Klushnik TP, Gratchev V V, Belichenko P V. Brain-directed autoantibodies levels in the serum of Rett syndrome patients. *Brain Dev*. 2001;23:113-117.
209. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *PNAS*. 2000;97(3):1-6.
210. De Filippis B, Valenti D, De Bari L, et al. Mitochondrial free radical overproduction due to respiratory chain impairment in the brain of a mouse model of Rett syndrome: Protective effect of CNF1. *Free Radic Biol Med*. 2015;83:167-177.
211. De Felice C, Signorini C, Durand T, et al. Partial rescue of Rett syndrome by  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) oil. *Genes Nutr*. 2012;7(3):447-458.
212. De Felice C, Della Ragione F, Signorini C, et al. Oxidative brain damage in Mecp2-mutant murine models of Rett syndrome. *Neurobiol Dis*. 2014;68:66-77.
213. Tan H, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in macrophage polarization: human diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-16.
214. O'Driscoll C, Kaufmann WE, Bressler J. Relationship between Mecp2 and NF $\kappa$ b signaling during neural differentiation of P19 cells. *Brain Res*. 2013;1490:35-42.

215. Bertoldi ML, Zalosnik MI, Fabio MC, et al. MeCP2 deficiency disrupts kainate-induced presynaptic plasticity in the mossy fiber projections in the hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2019;13(July):1-19.
216. Derecki NC, Cronk JC, Kipnis J. The role of microglia in brain maintenance: Implications for Rett syndrome. *Trends Immunol.* 2013;34(3):144-150.
217. Braun S, Kottwitz D, Nuber UA. Pharmacological interference with the glucocorticoid system influences symptoms and lifespan in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genetics.* 2012;21(8):1673-1680.
218. O'Driscoll CM, Lima MP, Kaufmann WE, Bressler JP. Methyl CpG binding protein 2 deficiency enhances expression of inflammatory cytokines by sustaining NF- $\kappa$ B signaling in myeloid derived cells. *J Neuroimmunol.* 2015;283:23-29.
219. Dandrea M, Donadelli M, Costanzo C, Scarpa A, Palmieri M. MeCP2/H3meK9 are involved in IL-6 gene silencing in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(20):6681-6690.
220. O'Driscoll CM, Kaufmann WE, Bressler JP. MeCP2 deficiency enhances glutamate release through NF- $\kappa$ B signaling in myeloid derived cells. *J Neuroimmunol.* 2013;265(1-2):61-67.
221. Zhao D, Mokhtari R, Pedrosa E, Birnbaum R, Zheng D, Lachman HM. Transcriptome analysis of microglia in a mouse model of Rett syndrome: differential expression of genes associated with microglia / macrophage activation and cellular stress. *Mol Autism.* 2017;8(17):1-12.
222. Wahba G, Schock SC, Cudd S, Grynspan D, Humphreys P. Activity and MeCP2-dependent regulation of nNOS levels in enteric neurons. *Neurogastroenterol Motil.* 2016:1-8.
223. Valacchi G, Pecorelli A, Cervellati C, Hayek J. 4-hydroxynonenal protein adducts: Key mediator in Rett syndrome oxinflammation. *Free Radic Biol Med.* 2017;111(December 2016):270-280.
224. 216. Jurberg AD, Cotta-de-Almeida V, Temerozo JR, Savino W, Bou-Habib DC, Riederer I. Neuroendocrine Control of Macrophage Development and Function. *Front Immunol.* 2018;9(June):1-14.
225. Soreq H, Wolf Y. NeurimmiRs: MicroRNAs in the neuroimmune interface. *Trends Mol Med.* 2011;17(10):548-555.
226. Veremeyko T, Siddiqui S, Sotnikov I, Yung A, Ponomarev ED. IL-4/IL-13-Dependent and Independent Expression of miR-124 and Its Contribution to M2 Phenotype of Monocytic Cells in Normal Conditions and during Allergic Inflammation. *PLoS One.* 2013;8(12):1-12.



227. Raes G, Baetselier P De, Noe W, Beschin A, Brombacher F. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2002;71(April):597-602.
228. Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, et al. FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol.* 2004;164(4):1315-1326.
229. Hu B, Gharaee-kermani M, Wu Z. Essential Role of MeCP2 in the Regulation of Myofibroblast Differentiation during Pulmonary Fibrosis. 2011;178(4):1500-1508.
230. Felice C De, Guazzi G, Rossi M, Ciccoli L. Unrecognized lung disease in classic Rett Syndrome. *Chest.* 2010;138(2):386-392.
231. Hutchison ER, Kawamoto EM, Taub DD, et al. Involvement of miR-181 in neuroinflammatory responses of astrocytes. *Glia.* 2015;61(7):1018-1028.
232. Conti V, Gandaglia A, Galli F, Tirone M, Bellini E. mecp2 affects skeletal muscle growth and morphology through non cell-autonomous mechanisms. *PLoS One.* 2015;10(6):1-16.
233. Theoharides TC, Athanassiou M, Panagiotidou S, Doyle R. Dysregulated brain immunity and neurotrophin signaling in Rett syndrome and autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol.* 2015;279(C):33-38.
234. Kishi N, MacDonald JL, Ye J, Molyneaux BJ, Azim E, Macklis JD. Reduction of aberrant NF- $\kappa$ B signalling ameliorates Rett syndrome phenotypes in MeCP2-null mice. *Nat Commun.* 2016;7(1):10520.
235. 227. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8(9):913-919.
236. Khorshid Ahmad T, Zhou T, AlTaweel K, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-induced elevated expression of the E1 isoform of methyl CpG binding protein 2 (MeCP2E1): Implications in multiple sclerosis (MS)-induced neurological disability and associated myelin damage. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1254.
237. Khorshid Ahmad T, Acosta C, Cortes C, Lakowski TM, Gangadaran S, Namaka M. Transcriptional regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) by Methyl CpG Binding Protein 2 (MeCP2): a novel mechanism for re-myelination and/or myelin repair involved in the treatment of Multiple Sclerosis (MS). *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1092-1107.
238. Webster KE, Walters S, Kohler RE, et al. In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med.* 2009;206(4):751-760.

239. Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. The role of IL-2 in the activation and expansion of regulatory T-cells and the development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Immunobiology*. 2013;218(4):674-682.
240. Stern JB, Smith KA. Interleukin-2 induction of T-Cell G1 progression and c-myb expression. *Science*. 1986;233(4760):203-206.
241. Beadling C, Smith KA. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Immunol*. 2002;1(2):1-14.
242. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis\* J. Interleukin-4: A Cytokine to Remember. *J Immunol*. 2012;189(9):4213-4219.
243. Falcone M, Rajan AJ, Bloom BR, Celia F. A critical role for Il-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice. *J Immunol*. 1998;160:4822-4830.
244. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci*. 2007;27(40):10714-10721.
245. Okuda Y, Sakoda S, Bernard CCA, et al. IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol*. 1998;10(5):703-708.
246. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, et al. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PNAS*. 2008;105(26):9041-9046.
247. 239. Dandrea M, Donadelli M, Costanzo C, Scarpa A, Palmieri M. MeCP2/H3meK9 are involved in IL-6 gene silencing in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(20):6681-6690.
248. 240. Bettelli E, Das MP, Howard ED, et al. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*. 1998;161:3299-3306.
249. Ferrarese C, Marzorati C, Perego M, Bianchi G, Pierpaoli C. Effect of Anticonvulsant Drugs on Peripheral Benzodiazepine Receptors of Human Lymphocytes. *Neuropharmacology*. 1995;34(4):427-431.
250. Scarf AM, Ittner LM, Kassiou M. The Translocator Protein (18 kDa): central nervous system disease and drug design. *J Med Chem*. 2009;52(3):581-592.
251. Venneti S, Lopresti B, Wiley C. The peripheral benzodiazepine receptor in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol*. 2007;80(6):308-322.
252. Lin C, Edelson BT. New Insights into the Role of IL-1 $\beta$  in EAE and MS. *Immunol*. 2018;198(12):4553-4560.

253. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. *Front Neurosci.* 2014;8(SEP):1-22.
254. Lévesque SA, Paré A, Mailhot B, et al. Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1 $\beta$  -driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Exp Med.* 2016;213(6):929-949.
255. Inoue M, Shinohara ML. NRLP3 inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Dis.* 2013;2013:1-8.
256. Pecorelli A, Cordone V, Messano N, et al. Altered inflammasome machinery as a key player in the perpetuation of Rett syndrome oxinflammation. *Redox Biol.* 2020;28(September 2019).
257. Jain A, Kaczanowska S, Davila E. IL-1 receptor-associated kinase signaling and its role in inflammation, cancer progression, and therapy resistance. *Front Immunol.* 2014;5(November):1-8.
258. Jordan C, Li HH, Kwan HC, Francke U. Cerebellar gene expression profiles of mouse models for Rett syndrome reveal novel MeCP2 targets. *BMC Med Genet.* 2007;8(16):1-16.
259. Tomasoni R, Morini R, Lopez-atalaya JP, et al. Lack of IL-1R8 in neurons causes hyperactivation of IL-1 receptor pathway and induces MECP2-dependent synaptic defects. 2017:1-26.
260. Valentin-Torres A, Savarin C, Hinton DR, Phares TW, Bergmann CC, Stohlman SA. Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflam.* 2016:1-14.
261. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders H. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev. Immunol.* 2014;(October):1-9.
262. Kishi N, MacDonald JL, Ye J, Molyneaux BJ, Azim E, Macklis JD. Reduction of aberrant NF- $\kappa$ B signalling ameliorates Rett syndrome phenotypes in Mecp2-null mice. *Nat Commun.* 2016;7:1-13.
263. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-530.
264. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci.* 2006;9(7):917-924.

265. Horiuchi M, Smith L, Maezawa I, Jin L. CX3CR1 ablation ameliorates motor and respiratory dysfunctions and improves survival of a Rett syndrome mouse model. *Behav Immun.* 2016;60:106-116.
266. Huang D, Shi F, Jung S, et al. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J.* 2006;20(7):896-905.
267. Delgado IJ, Kim DS, Thatcher KN, Lasalle JM, Veyver IB Van Den. Expression profiling of clonal lymphocyte cell cultures from Rett syndrome patients. *BMC Med Genet.* 2006;13:1-13.
268. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100:655-669.
269. Tong Y, Aune T, Boothby M. T-bet antagonizes mSin3a recruitment and transactivates a fully methylated IFN- $\lambda$  promoter via a conserved T-box half-site. *PNAS.* 2005;102(6):2034-2039.
270. Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R. Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6(SEP):1-9.
271. Olsson T. Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 1995;144(1):245-268.
272. Horwitz M, Evans C, McGavern D, Rodriguez M, Oldstone M. Primary demyelination in transgenic mice expression interferon-gamma. *Nat Med.* 1997;3(9):1037-1041.
273. Wang Z, Hong J, Sun W, et al. Role of IFN- $\gamma$  in induction of Foxp3 and conversion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells to CD4<sup>+</sup> Tregs. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2434-2441.
274. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3 regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol.* 2015;2:558-565.
275. Koutrolos M, Berer K, Kawakami N, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(163):1-7.
276. McGeachy MJ, Stephens LA, Stephen M, Mcgeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural Recovery and Protection from Autoimmune Encephalomyelitis: Contribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory Cells within the Central Nervous System. *J Immunol.* 2005;175:3025-3032.

277. Korn T, Reddy J, Gao W, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007;13(4):423-431.
278. Noori-zadeh A, Mesbah-namin SA, Saboor-yaraghi AA. Epigenetic and gene expression alterations of FOXP3 in the T cells of EAE mouse model of multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2017;375:203-208.
279. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker1 LT, Bluestone JA. Plasticity of CD4+ FOXP3 T cells. *Current Opinion in Immunol.* 2009;21(3):281-285.
280. Guo B. IL-10 modulates Th17 pathogenicity during autoimmune diseases. *J Clin Cell Immunol.* 2016;7(2):1-16.
281. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol.* 1998;188:118-124.
282. Horvath PM, Monteggia LM. MeCP2 as an activator of gene expression. *Trends Neurosci.* 2018;41(2):72-74.
283. Cortelazzo A, de Felice C, Leoncini S, et al. Inflammatory protein response in CDKL5-Rett syndrome: evidence of a subclinical smouldering inflammation. *Inflamm Res.* 2017;66(3):269-280.
284. Chowdhury D, Hell JW. Homeostatic synaptic scaling: molecular regulators of synaptic AMPA-type glutamate receptors. *F1000Research.* 2018;7(0):1-9.

